



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YEŞİL SENTEZLENEN ALTIN  
NANOPARTİKÜLÜN AKCİĞER KANSERİ  
HÜCRE HATTINDA BOYUT ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ

Pınar Elife DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Aralık-2023  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

Pınar Elife DOĞAN tarafından hazırlanan “Yeşil Sentezlenen Altın Nanopartikülün Akciğer Kanseri Hücre Hattında Boyut Etkisinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 12/12/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Prof. Dr. Esmâ MENEVŞE

#### Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

#### Üye

Prof. Dr. Esmâ MENEVŞE

#### Üye

Doç. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../2023 gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife Yurdagül KUMCU  
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından 221315004 nolu proje ile desteklenmiştir.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Pınar Elife DOĞAN

Tarih:

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

## YEŞİL SENTEZLENEN ALTIN NANOPARTİKÜLÜN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA BOYUT ETKİSİNİN İNCELENMESİ

**Pınar Elife DOĞAN**

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU**

**2023, 153 Sayfa**

**Jüri**

**Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU**

**Prof. Dr. Esmâ MENEVŞE**

**Doç. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK**

Heterojen ve agresif fenotip gösteren küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), dünya çapında kanserden ölümlerin en sık nedenidir. Tüm erkek ve kadın popülasyonlarında en yaygın ve en ölümcül malignite olarak bilinmektedir. Akciğer kanseri vakalarının çoğuna geç evrelerde teşhis konulmaktadır ve genel sağkalım oranları düşüktür. Akciğer kanseri tedavisinde cerrahi hala kullanılan temel yaklaşımdır; ancak çok sayıda hasta nüks ve ilaç tedavisi başarısızlığı nedeniyle ölmektedir. Cerrahiye takiben kullanılan çoğu kemoterapötik ilaç hem kanser hem de sağlıklı hücrelerde sistemik sitotoksiteye ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, yeni terapötik hedeflerin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç artmaktadır. Yeşil sentezlenen altın nanopartiküllerin (AuNP) moleküler çözünürlükte hücrelerle etkileşime girebilmesi ve üstün biyoyumluluk sağlaması nedeniyle yakın zamanda insanlarda akciğer kanseri tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar olarak hizmet edebileceği öngörülmektedir. Diğer nanopartiküllere göre daha kararlı ve biyoyumlu metal nanopartikül olan AuNP'ler antifungal, antibakteriyel, antiviral ve antikanser aktiviteleri sayesinde tıpta yaygın olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte COX-2 seçici inhibitör olan Celecoxib, kanserin tedavisi ve önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. COX-2 inhibitörleriyle birlikte çeşitli antineoplastik ilaçların kullanılması kanser kontrolü ve tedavisi için umut vaat etmektedir. AuNP ve Celecoxib ajanının kombine tedavisinin akciğer kanserinde tümör baskılayıcı aktivitelere aracılık ederek tümör ilerlemesini inhibe etmek için potansiyel yeni bir stratejiyi temsil edebileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda yapılacak olan çalışmalar akciğer kanseri ilerlemesinin önlenmesi ve tedavisine büyük ölçüde katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında yeşil sentez ile antikanser etkisi bilinen *Orchis Spitzelii* (Salep) bitkisinin kök kısmının sulu ekstrakt konsantrasyonu değiştirilerek farklı boyutlarda AuNP sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen AuNP'ler UV-Vis, XRD, FT-IR, DLS, Zeta potansiyel, TEM ve FESEM-EDX yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Artan dozlarda yeşil sentezlenen AuNP'ler, *Orchis Spitzelii* (Salep) bitki ekstraktı ve Celecoxib ajanı ile NCI-H441 insan akciğer kanseri ve HUVEC hücre hattı 24 saat boyunca muamele edilmiştir. NCI-H441 insan akciğer kanseri ve HUVEC sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Belirlenen IC<sub>50</sub> dozları ile PPAR $\gamma$  sinyal yolağı ve anjiyogenez, invazyon, metastaz, yağ asidi metabolizması ile ilgili hedef genler olan CD36, TIMP2, MMP2, PGE2, COX-2 ve VEGFR2 gen ekspresyonlarındaki değişiklikler qRT-PCR ile incelenmiştir. Ek olarak EMT sürecinde yer alan MMP2 protein düzeyi değişimi Western Blot yöntemiyle incelenmiştir.

Yeşil sentezlenen AuNP'lerin hücre canlılığı testi sonucunda boyutları küçüldükçe sitotoksitelerinin arttığı, qRT-PCR sonucunda Ekstrakt ve Celecoxib ajanından daha iyi seviyede anjiyogenez ve EMT süreci ile ilişkili olan PPAR $\gamma$ , CD36 ve TIMP2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde upregüle ettiği ve MMP2, PGE2, COX-2 ve VEGFR2 genlerinin ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Western Blot çalışması, gen ekspresyon çalışmalarıyla paralel olarak MMP2 protein düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılandığını göstermiştir. Çalışma kapsamında tüm veriler değerlendirildiğinde yeşil sentezlenen AuNP'lerin arzu edilen şekilde NCI-H441 akciğer kanseri hücrelerine kıyasla sağlıklı HUVEC hücrelerine karşı daha yüksek biyouyumluluk sergilediği belirlenmiştir. Yeşil sentezlenen AuNP'lerin, akciğer kanseri hücrelerinde MMP-2'nin indüklediği EMT'yi ve VEGFR2'nin indüklediği anjiyogenezi inhibe ettiğini ve metastazı önlediğini gösterdik. PPAR $\gamma$ 'nın AuNP'ler ile aktivasyonu, mezenkimal belirteç olan MMP2 ekspresyonunu önlemektedir. AuNP'lerin düşük toksisite profiliyle birlikte verilerimiz, bu nanopartiküllerin metastazı inhibe etmek için potansiyel terapötik ajanlar olarak hizmet edebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Altın nanopartikül, Boyut Etkisi, Celecoxib, Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, Matriks Metalloproteinaz 2, *Orchis Spitzelii* (Salep), Yeşil sentez

## ABSTRACT

## MS THESIS

### INVESTIGATION OF THE SIZE EFFECT OF GREEN SYNTHESIS GOLD NANOPARTICLE ON LUNG CANCER CELL LINE

Pınar Elife DOĞAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
Department of Molecular Biology and Genetics

Advisor: Asst. Prof. Dr. Emine Nedime KORUCU

2023, 153 Pages

#### Jury

Advisor Asst. Prof. Dr. Emine Nedime KORUCU

Prof. Dr. Esma MENEVŞE

Assoc. Prof. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

Non-small cell lung cancer (NSCLC), which exhibits a heterogeneous and aggressive phenotype, is the most common cause of cancer deaths worldwide. It is known as the most common and deadliest malignancy in all male and female populations. Most cases of lung cancer are diagnosed in the late stages and overall survival rates are low. Surgery is still the main approach used in the treatment of lung cancer; however, many patients die due to relapse and drug treatment failure. Most chemotherapeutic drugs used following surgery cause systemic cytotoxicity and serious side effects in both cancer and healthy cells. Therefore, there is an increasing need for further investigation of new therapeutic targets. It is predicted that green synthesized gold nanoparticles (AuNP) may recently serve as potential therapeutic agents in treating lung cancer in humans, as they can interact with cells at molecular resolution and provide superior biocompatibility. AuNPs, which are metal nanoparticles that are more stable and biocompatible than other nanoparticles, have the potential to be widely used in medicine thanks to their antifungal, antibacterial, antiviral, and anticancer activities. However, Celecoxib, a COX-2 selective inhibitor, plays an important role in the treatment and prevention of cancer. The use of various antineoplastic drugs in combination with COX-2 inhibitors holds promise for cancer control and treatment. It is thought that the combined treatment of AuNP and Celecoxib agent may represent a potential new strategy to inhibit tumor progression by mediating tumor suppressor activities in lung cancer. Studies to be carried out in this context will greatly contribute to preventing and treating lung cancer progression.

In this thesis study, AuNPs of different sizes were synthesized by changing the aqueous extract concentration of the root part of the *Orchis Spitzelii* (Salep) plant, which is known to have an anticancer effect, with green synthesis. Synthesized AuNPs were characterized by UV-Vis, XRD, FT-IR, DLS, Zeta potential, TEM, and FESEM-EDX methods. NCI-H441 human lung cancer and HUVEC cell line were treated with increasing doses of green synthesized AuNPs, *Orchis Spitzelii* (Salep) plant extract, and Celecoxib agent for 24 hours. The cytotoxic effects of NCI-H441 on human lung cancer and the HUVEC healthy cell line were determined by cell viability testing. With the determined IC<sub>50</sub> doses, changes in the gene expressions of CD36, TIMP2, MMP2, PGE2, COX-2, and VEGFR2, which are target genes related to the PPAR $\gamma$  signaling pathway and angiogenesis, invasion, metastasis, and fatty acid metabolism, were examined by qRT-PCR. In addition, the MMP2 protein level change involved in the EMT process was examined by the Western Blot method.

As a result of the cell viability test, green synthesized AuNPs showed that their cytotoxicity increased as their size decreased, and as a result of qRT-PCR, they statistically significantly upregulated PPAR $\gamma$ , CD36, and TIMP2 gene expression, which are associated with angiogenesis and EMT process, at a better level than Extract and Celecoxib agent, and MMP2, PGE2. It was concluded that it downregulated the expression of COX-2 and VEGFR2 genes in a statistically significant way. Western Blot study showed statistically significant suppression of MMP2 protein level in parallel with gene expression studies.

When all data were evaluated within the scope of the study, it was determined that green synthesized AuNPs exhibited higher biocompatibility against healthy HUVEC cells compared to NCI-H441 lung cancer cells, as desired. We showed that green synthesized AuNPs inhibited MMP-2-induced EMT and VEGFR2-induced angiogenesis in lung cancer cells and prevented metastasis. Activation of PPAR $\gamma$  with AuNPs prevents the expression of MMP2, a mesenchymal marker. Together with the low toxicity profile of AuNPs, our data suggest that these nanoparticles may serve as potential therapeutic agents to inhibit metastasis.

**Keywords:** Gold nanoparticle, Size Effect, Celecoxib, Non-small cell lung cancer, Matrix Metalloproteinase 2, *Orchis Spitzelii* (Salep), Green synthesis

## ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, akademik açıdan yetişmemi sağlayan, her konuda fikirlerime değer veren, tüm zorluklara rağmen pes etmeden yoluma devam etmemde bana destek olan ve bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU'ya,

Tez çalışmalarım esnasında hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, nanopartikül sentezinde bana destek olan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her zaman olumlu tavrıyla beni cesaretlendiren değerli hocam Doç. Dr. Fatih ERCİ'ye,

Lisans döneminde aynı sıralarda oturduğum, yüksek lisans sürecini beraber geçirdiğim ve zorluklara birlikte göğüs gerdiğim, bu süreçte her zaman yanımda olan ve desteğiyle bana güç veren meslektaşım, arkadaşım Şevval ÖZKAYA'ya

Hayatımın her anında beni destekleyen ve bana sonsuz güvenen, aldığım her kararda koşulsuz arkamda duran, beni koşulsuz seven, onlara sahip olduğum için kendimi daima dünyanın en şanslı kişisi olarak atfetmemi sağlayan yol göstericilerim biricik annem Ayşegül DOĞAN, babam Harun DOĞAN ve her zaman yanımda olup bana yoldaş olan yüzümü güldüren destekçilerim, motivasyon kaynağı kardeşlerim Sümeyye, Berra Nur ve Muhammed Talha DOĞAN'a

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) bünyesinde faaliyet gösteren Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile bana destek oldukları için sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Pınar Elife DOĞAN  
KONYA-2023

Bu tezi dualarıyla hep yanımda olan, bu süreçlere gelmemi isteyen ve bana her daim inanan rahmetli anneannem Sultan KAPLAN'a ve en değerli varlığım olan aileme ithaf ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	3
2.1. Akciğer ve Akciğer Kanseri .....	3
2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2 Akciğer Kanseri Histolojisi .....	6
2.1.3. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri .....	7
2.1.4. Akciğer Kanserinde Evreleme .....	11
2.1.5. Akciğer Kanserinde Belirti ve Bulgular .....	13
2.1.6. Akciğer Kanserinde Teşhis ve Tedavi .....	13
2.1.7. Akciğer Kanseri ve Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) .....	15
2.2. Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler (PPAR).....	17
2.2.1. PPAR'ların Yapısı .....	17
2.2.2. PPAR İzoförmları .....	19
2.3. Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve Kanserde COX-2 İnhibitörlerinin Etkisi.....	23
2.4. <i>Orchis Spitzelii</i> ( <i>Salep</i> ).....	25
2.5. Nanoteknoloji.....	27
2.5.1. Nanopartiküllerin Özellikleri ve Sınıflandırılması .....	28
2.5.2. Metal Nanopartiküller .....	29
2.5.2.1. Altın Nanopartiküller .....	29
2.5.2.2. Altın Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri .....	31
2.5.2.3. Altın Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi.....	33
2.5.2.4. Altın Nanopartikülün Antikanser Etkileri.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1. Altın Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu .....	38
3.1.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması.....	38
3.1.2. Altın Nanopartikül Sentezi .....	38
3.1.3. Altın Nanopartikül Karakterizasyonu .....	39
3.2. Hücre Kültürü ve Altın Nanopartikül Uygulaması.....	39
3.2.1. Hücre Kültürü .....	39
3.2.2. Hücre Sayımı .....	40
3.2.3. Hücre Canlılık Testi.....	41
3.3. RNA İzolasyonu, Konsantrasyon ve Saflık Ölçümü .....	41
3.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi .....	42
3.3.2.cDNA Sentezi .....	43

3.3.3. Primer Dizaynı .....	44
3.3.4. qRT-PCR .....	45
3.4. Western Blot ile Protein Kantitasyon Analizi.....	46
3.4.1. Hücre Lizatların Hazırlanması .....	46
3.4.2. Protein Miktar Analizi .....	46
3.4.3. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması ve Elektroforez.....	47
3.4.4. Proteinlerin Membrana Transferi.....	48
3.4.5. Bloklama .....	48
3.4.6. Primer ve Sekonder Antikor İnkübasyonu.....	48
3.4.7. ECL ile Görüntüleme .....	48
3.5. İstatistiksel Analiz.....	49
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>50</b>
4.1. Altın Nanopartikül Sentezi .....	50
4.2. Altın Nanopartikül Karakterizasyonu .....	52
4.2.1. Altın Nanopartiküllerin UV-Vis Karakterizasyonu .....	52
4.2.3. Altın Nanopartiküllerin XRD ve FTIR Analizi .....	53
4.2.3. Altın Nanopartiküllerin DLS ve Zeta Potansiyel Analizi .....	57
4.2.5. Altın Nanopartiküllerin FE-SEM/ EDX Karakterizasyonu .....	60
4.2.6. Altın Nanopartiküllerin TEM Karakterizasyonu .....	65
4.3. Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstraktın NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattı Üzerindeki Morfoloji Değişiminin İncelenmesi .....	66
4.4. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Yeşil Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi .....	70
4.4.1. Sentezlenen Altın Nanopartiküllerin NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattında Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	71
4.4.2. Tetrakloroaurik Asit ( $\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )'in NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattında Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	74
4.4.3. <i>Orchis Spitzelii</i> Ekstraktının NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattında Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi .....	76
4.4.4. Celecoxib Etken Maddesinin NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattında Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi .....	77
4.5. Jel Elektroforezinde RNA Numunelerinin Tayini .....	78
4.6. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının Gen Ekspresyonlarına Etkisinin İncelenmesi.....	78
4.6.1. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının CD36 Gen Ekspresyonuna Etkisi .....	79
4.6.2. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının PPAR $\gamma$ Gen Ekspresyonuna Etkisi .....	80

4.6.3. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının TIMP2 Gen Ekspresyonuna Etkisi .....	82
4.6.4. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının MMP2 Gen Ekspresyonuna Etkisi.....	83
4.6.5. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının COX-2 Gen Ekspresyonuna Etkisi .....	85
4.6.6. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Ekstrakt ve Celecoxib Uygulamasının PGE2 Gen Ekspresyonuna Etkisi .....	86
4.6.7. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Ekstrakt ve Celecoxib Uygulamasının VEGFR2 Gen Ekspresyonuna Etkisi.....	88
4.7. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının Protein Düzeyine Etkileri .....	90
4.8. TARTIŞMA .....	92
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>100</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>102</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Akciğerler ve solunum sistemi.....	3
Şekil 2.2. Sağ akciğer (A) ve sol akciğerin (B) iç kısımda görünümü.....	3
Şekil 2.3. GLOBOCAN 2020 verilerine göre akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi....	5
Şekil 2.4. Erkek ve kadınlarda kanser mortalitesi oranları, Amerika Birleşik Devletleri, 1930–2020.....	5
Şekil 2.5. Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması.....	6
Şekil 2.6. Akciğer kanseri risk faktörlerinin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.7. EMT'nin 16 kanonik gen belirteci.....	16
Şekil 2.8. PPAR'ların yapısal organizasyonu.....	18
Şekil 2.9. İnsan PPAR $\gamma$ geninin genomik organizasyonu.....	20
Şekil 2.10. PPAR $\gamma$ ve diğer sinyal yollarının karşılıklı çapraz düzenlenmesi ve etkileri.....	21
Şekil 2.11. COX-2 inhibitörlerinin ve diğer ajanlarla kombine tedavisi sonucunda moleküler hedefleri üzerindeki etkileri.....	24
Şekil 2.12. a. Salep bitkisinin doğal yaşam alanı, b. Salep bitkisinin yaprak ve yumru bölümleri.....	25
Şekil 2.13. Farklı boyutlardaki nanomalzemelerin karşılaştırılması.....	27
Şekil 2.14. Antikanser tanı ve tedavi uygulamalarında yaygın olarak kullanılan altın nanopartikül türleri .....	30
Şekil 2.15. Nanopartiküllerin sentezi için kullanılan protokoller (a) aşağıdan yukarıya yaklaşım ve (b) yukarıdan aşağıya yaklaşım.....	32
Şekil 2.16. AuNP'lerin yeşil sentezi ve uygulama alanları.....	34
Şekil 2.17. AuNP'lerin anti-kanser etkilerinden etkilenen moleküler yolaklar.....	36
Şekil 4.1. Zamana bağlı renk değişimi. a. Altın sulu çözeltisi ve ekstrakt karışımının ilk hali, b. Süre sonunda yakut kırmızısı renginin gözlemlenmesi.....	50
Şekil 4.2. Altın nanopartikül sentezinin gösterimi. <b>a.</b> Tetrakloroaurik Asit çözeltisi, <b>b.</b> Salep ( <i>Orchis Spitzelii</i> ) sulu ekstraktı, <b>c.</b> Sentezlenen Altın Nanopartiküller.....	52
Şekil 4.3. AuNP ve ekstraktın zamana bağlı UV-Vis spektrumu değişimi.....	53
Şekil 4.4. Sentezlenen altın nanopartiküllerin XRD analizi.....	54
Şekil 4.5. Salep ekstraktının FTIR spektrum analizi.....	55
Şekil 4.6. 48 nm AuNP'ün FTIR spektrum analizi.....	55
Şekil 4.7. 31 nm AuNP'ün FTIR spektrum analizi.....	56
Şekil 4.8. 12 nm AuNP'ün FTIR spektrum analizi.....	56
Şekil 4.9. 48 nm AuNP'ün DLS ile boyut analizi.....	57
Şekil 4.10. 31 nm AuNP'ün DLS ile boyut analizi.....	58
Şekil 4.11. 12 nm AuNP'ün DLS ile boyut analizi.....	58
Şekil 4.12. 48 nm AuNP'ün Zeta Potansiyel analizi.....	59
Şekil 4.13. 31 nm AuNP'ün Zeta Potansiyel analizi.....	59
Şekil 4.14. 12 nm AuNP'ün Zeta Potansiyel analizi.....	60
Şekil 4.15. Sentezlenen 48 nm AuNP'ün FESEM analiz sonucu.....	61
Şekil 4.16. 48 nm AuNP'ün EDX analizi.....	61
Şekil 4.17. Sentezlenen 31 nm AuNP'ün FESEM analiz sonucu.....	62

Şekil 4.18. Sentezlenen 31 nm AuNP'ün EDX analizi.....	63
Şekil 4.19. Sentezlenen 12 nm AuNP'ün FESEM analiz sonucu.....	64
Şekil 4.20. Sentezlenen 12 nm AuNP'ün EDX analizi.....	64
Şekil 4.22. Sentezlenen 48 nm AuNP'ün TEM analiz görüntüsü.....	65
Şekil 4.23. Sentezlenen 31 nm AuNP'ün TEM analiz görüntüsü.....	65
Şekil 4.24. Sentezlenen 12 nm AuNP'ün TEM analiz görüntüsü.....	66
Şekil.4.25. NCI-H441 hücrelerinin 48 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500 µM, c. 1500 µM.....	67
Şekil.4.26. HUVEC hücrelerinin 48 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500 µM, c. 1500 µM.....	67
Şekil.4.27. NCI-H441 hücrelerinin 31 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500 µM, c. 1500 µM.....	67
Şekil.4.28. HUVEC hücrelerinin 31 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500 µM, c. 1500 µM.....	67
Şekil.4.29. NCI-H441 hücrelerinin 12 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500 µM, c. 1500 µM.....	68
Şekil.4.30. HUVEC hücrelerinin 12 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500 µM, c. 1500 µM.....	68
Şekil.4.31. NCI-H441 hücrelerinin Tetrakloroaurik Asit uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 30 µM, c. 45 µM.....	68
Şekil.4.32. HUVEC hücrelerinin Tetrakloroaurik Asit uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 30 µM, c. 45 µM.....	69
Şekil.4.33. NCI-H441 hücrelerinin Salep ekstraktının uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 75 µM, c. 150 µM.....	69
Şekil.4.34. HUVEC hücrelerinin Salep ekstraktının uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 75 µM, c. 150 µM.....	69
Şekil.4.35. NCI-H441 hücrelerinin Celecoxib uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 60 µM, c. 150 µM.....	70
Şekil.4.36. HUVEC hücrelerinin Celecoxib uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 60 µM, c. 150 µM.....	70
Şekil.4.37. Hücre canlılık analizinin aşamalı gösterimi.....	71
Şekil 4.38. NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat 48 nm AuNP ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	72
Şekil 4.39. NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat 31 nm AuNP ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	73
Şekil 4.40. NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat 12 nm AuNP ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	74
Şekil 4.41. NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat Tetrakloroaurik Asit ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	75

Şekil 4.42. NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat Ekstrakt ( <i>Orchis Spitzelii</i> ) ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	76
Şekil 4.43. NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat Celecoxib ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	77
Şekil 4.44. RNA örneklerinin bant profili.....	78
Şekil 4.45. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu CD36 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi....	79
Şekil 4.46. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu CD36 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi.....	80
Şekil 4.47. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu PPAR $\gamma$ gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi...81	81
Şekil 4.48. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu PPAR $\gamma$ gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi.....	81
Şekil 4.49. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu TIMP2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi...82	82
Şekil 4.50. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu TIMP2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi.....	83
Şekil 4.51. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu MMP2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi...84	84
Şekil 4.52. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu MMP2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi.....	84
Şekil 4.53. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu COX-2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi...85	85
Şekil 4.54. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu COX-2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi.....	86
Şekil 4.55. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu PGE2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi....87	87

Şekil 4.56. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu PGE2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi.....	87
Şekil 4.57. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu VEGFR2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi...88	88
Şekil 4.58. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu VEGFR2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi.....	89
Şekil 4.59. NCI-H441 hücre hattında Western analizi sonucu protein seviyelerinin değişimi.....	90
Şekil 4.60. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu MMP2 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi.....	91

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi.....	11
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattının özellikleri...	38
Tablo 3.2. cDNA Sentezinde Kullanılan RNA, Primer ve Su Bileşenlerinin Miktarları.....	42
Tablo 3.3. cDNA Sentezinde Enzim Karışımı İçin Kullanılan Bileşenlerin Miktarları.....	42
Tablo 3.4. Ekspresyon analizinde kullanılan genlere spesifik primer dizileri.....	43
Tablo 3.5. qRT-PCR’da kullanılacak reaktifler ve miktarları.....	44
Tablo 3.6. qRT-PCR Basamaklarının Sıcaklık ve Süreleri.....	44
Tablo 3.7. SDS Page Jel İçeriği.....	46
Tablo 4.1. Sentezlenen altın nanopartiküllerin sentez parametreleri.....	50

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
$\gamma$	Gama
$\mu$	Mikro
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
ml	Mililitre
RPM	Dakikada Devir Sayısı

### Kısaltmalar

AF-1	Aktivasyon faktör 1
AF-2	Aktivasyon faktör-2
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
$\alpha$ -SMA	Alfa-düz kas aktin
AuNP	Altın Nanopartikül
COX-2	Siklooksijenaz-2
COXİB	COX-2 Seçici İnhibitör
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDX	Enerji Dağılımlı X- ışını Spektroskopisi
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
FBS	Fetal Dana Serumu
FT-IR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi
GCO	Küresel Kanser Gözlemevi
$\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Tetrakloroaurik Asit
HIV	İnsan bağışıklık eksikliği virüsü
HPV	İnsan Papilloma Virüsü

<b>IARC</b>	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
<b>IASLC</b>	Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Birliği
<b>IC<sub>50</sub></b>	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
<b>KHAK</b>	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
<b>KHDAK</b>	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
<b>KOAH</b>	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
<b>LCFA</b>	Amerika Akciğer Kanseri Vakfı
<b>MD</b>	Mamografik Yoğunluk
<b>MMP</b>	Matriks Metalloproteinaz
<b>MMP-2</b>	Matriks Metalloproteinaz 2
<b>MNP</b>	Metal Nanopartikül
<b>MTT</b>	3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür
<b>NE</b>	Nöroendokrin
<b>NM</b>	Nanomalzeme
<b>nm</b>	Nanometre
<b>NP</b>	Nanopartikül
<b>NR1C1</b>	Nükleer Reseptör Alt Ailesi 1, Grup C, Üye 1
<b>NR1C2</b>	Nükleer Reseptör Alt Ailesi 1, Grup C, Üye 2
<b>NR1C3</b>	Nükleer Reseptör Alt Ailesi 1, Grup C, Üye 3
<b>NSAID</b>	Steroid Olmayan Anti-inflamatuar İlaç
<b>PGE2</b>	Prostaglandin Endoperoksit 2
<b>PPAR</b>	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler Alfa
<b>PPAR<math>\beta/\delta</math></b>	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler Beta/Delta
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler Gama
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>ROS1</b>	ROS proto-onkogen 1
<b>RXR</b>	Retinoid X Reseptörü
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskopu
<b>SPR</b>	Yüzey Plazmon Rezonans
<b>TEM</b>	Transmisyon Elektron Mikroskopu
<b>TIMP</b>	Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri
<b>US EPA</b>	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
<b>UV-Vis</b>	Ultraviyole görünür bölge spektroskopisi

<b>VEGF</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>VEGFR2</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör 2
<b>XRD</b>	X Işını Kırınımı

## 1. GİRİŞ

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve diğer organlara yayılmasıyla vücudun hemen hemen her organında veya dokusunda başlayabilen heterojen bir hastalık grubu olarak bilinmektedir (World Health Organization, 2023). Kanser dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur ve gelişmiş ülkelerde ölümlerin önde gelen nedenidir (Siegel, Miller, Wagle ve Jemal, 2023; Sung ve diğerleri, 2021). Akciğer kanseri ise dünya çapında kanserden ölümlerin en sık nedenidir (Bray ve diğerleri, 2018). Akciğer kanseri tedavisinde cerrahi hala kullanılan temel yaklaşımdır; ancak çok sayıda hastada ilaç tedavilerine rağmen nüks gelişmekte ve hastalar hayatlarını kaybetmektedir (Tartour ve Zitvogel, 2013).

Son çalışmalarda Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörlerin (PPAR) kanserin ilerlemesinde, hücre farklılaşmasında ve apoptozda rol oynadığı gösterilmiştir. PPAR ligandlarını ve PPAR sinyal yollarını etkileyen diğer ajanların, çeşitli insan kanserlerinde tümör baskılayıcı aktivitelere aracılık ederek kemopreventif potansiyele sahip oldukları ve tümör karsinogenezini ve ilerlemesini inhibe etmek için potansiyel yeni bir stratejiyi temsil edebileceği gösterilmiştir (Sertznig, Seifert, Tilgen ve Reichrath, 2007). PPAR $\gamma$ , PPAR nükleer reseptör ailesinin en çok çalışılmış üyesidir ve aktivitesinin hem ligand bağımlı hem de ligand bağımsız modülasyon yöntemleri oluşturulmuştur. Bu bağlamda, günümüzde piyasada PPAR $\gamma$  modülasyonuna yönelik yeni ilaç tasarımıyla ilgili bilimsel araştırmalara odaklanılmaktadır (Okine, Gaspar ve Finn, 2019). Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşümü, epitelyal belirteçlerin kaybına ve mezenkimal özelliğin kazanılmasına neden olmaktadır (Xiao ve He, 2010). Uzak metastaz, akciğer kanserinde kötü prognozun başlıca nedeni olmaya devam etmektedir (Huang ve diğerleri, 2019). Yapılan bir çalışmada PPAR $\gamma$  aktivitesinin azalması sonucu akciğer kolonizasyonu ve uzak metastazların meydana geldiği gösterilmiştir (Jiarong Chen ve diğerleri, 2020). Reka ve arkadaşları, PPAR $\gamma$ 'nın sentetik ligandlar tarafından aktivasyonunun, A549 akciğer kanseri hücrelerinde Matriks metalloproteinaz (MMP) seviyelerinin azalması sonucu epitelyal-mezenkimal geçişe (EMT) bağlı hücresel migrasyon ve invazyonu inhibe ettiğini göstermiştir (Reka ve diğerleri, 2010). Bununla birlikte, tümör mikro çevresinde bulunan inflamatuvar hücrelerin neoplastik süreçte yer aldığı, hücre çoğalmasını, sağ kalımını, invazyon ve metastazı teşvik ettiği genel olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, kanser tedavisinde anti-inflamatuvar ilaçların kullanılmasının umut vaat edebileceği düşünülmektedir.

Bu sorunla ilişkili potansiyel bir yol, siklooksijenaz-2 inhibisyonudur; özellikle bu enzimin aşırı ekspresyonunun kanser dokularında meydana geldiği ve aynı zamanda çeşitli insan malignite türlerinde kötü prognozla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. COX-2 seçici inhibitör olan Celecoxib, 20 yılı aşkın süredir özellikle anti-inflamatuar, analjezik ve antipiretik ilaç olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda Celecoxibin antineoplastik etkileri üzerine yapılan araştırmaların büyük çoğunluğu, etki mekanizmalarını açıklamaya çalışan klinik öncesi çalışmalara atıfta bulunmaktadır. Hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalar, Celecoxibin kanserin tedavisinde ve önlenmesindeki rolüne ilişkin umut verici sonuçlar ortaya koymuştur (Tołoczko-Iwaniuk, Dziemiańczyk-Pakieła, Nowaszewska, Celińska-Janowicz ve Miltyk, 2019).

Nanopartiküller (NP'ler) farklı bilim dallarında geniş çapta araştırılmaktadır ve nanotıp ajanları, kansere karşı terapötik yaklaşımlar geliştirme konusunda umut vaat etmektedir (Aghehati-Maleki ve diğerleri, 2020). Çok sayıda NP türü arasında altın nanopartiküller (AuNP'ler), biyouyumluluk, plazmonik özellikler, son derece gelişmiş kimya, kolay hazırlanma ve fizikokimyasal stabilite gibi benzersiz özelliklerinden dolayı hastalık teşhis ve tedavisinde büyük ilgi görmektedir (Aghaie ve diğerleri, 2019; Bouché ve diğerleri, 2020; Y. Wang, Xu, Shi ve Yang, 2020).

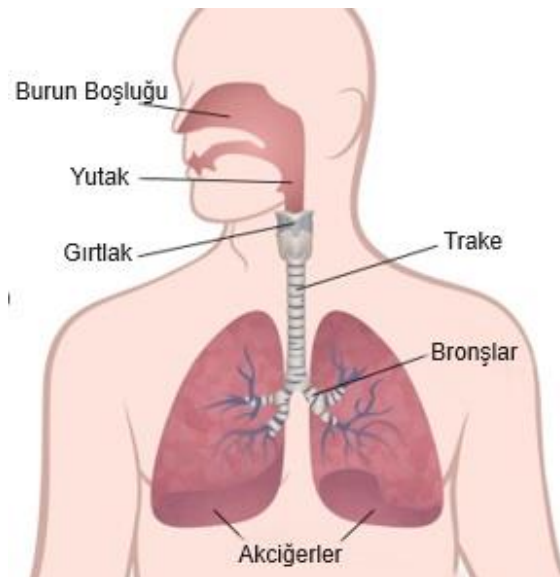
Bu çalışmada, NCI-H441 insan akciğer kanseri hücre hattında yeşil sentezlenen AuNP'lerin boyut etkisinin ve COX-2 inhibitörü olan Celecoxib ile kombine tedavisi sonucunda PPAR $\gamma$  sinyal yolağı ve EMT sürecinde yer alan genler üzerindeki etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. COX-2 inhibitörleriyle birlikte çeşitli ilaçların kullanılmasının kanser kontrolü ve tedavisi için umut vaat ettiği bilinmektedir. Literatürde NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında AuNP'lerin boyut etkisinin ve Celecoxib ilacının kombine uygulanması sonucunda EMT ve anjiyogenez süreci ile ilişkili CD36, TIMP-2, MMP-2, VEGFR2, COX2, PGE2 genleri ve PPAR $\gamma$  sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

AuNP ve COX-2 inhibitörlerinin kombine tedavisinin kanserdeki rolüne ilişkin bilgi arttıkça, kanser ve kanserde kötü prognozun başlıca nedenlerinden olan metastazın önlenmesi ve tedavisi için terapötik hedefler olarak kullanılması potansiyeli artmaktadır. Akciğer kanserini tedavi etmek amacıyla güvenli ve etkili moleküler hedefli tedavi yöntemlerinin araştırılması önemlidir.

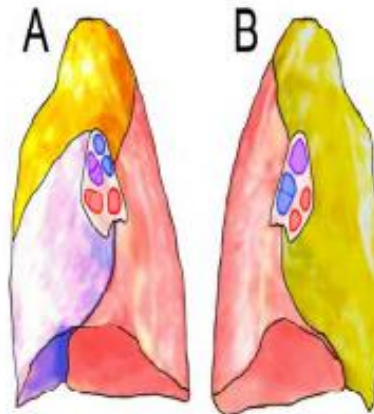
## 2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Akciğer ve Akciğer Kanseri

Akciğerler, ince seröz bir zar olan plevral kese ile sarılı, yüzeyi parlak ve pürüzsüz koni yapısında organlardır. Akciğerler göğüs boşluğu içerisine yerleşmiştir (Şekil 2.1) (Schulte, Schumacker ve Schünke, 2015; Unur, Ülger ve Ekinci, 2012). Sağ akciğer daha büyük olmakla birlikte üç lobdan meydana gelirken, daha küçük olan sol akciğer ise iki lobdan oluşmaktadır (Şekil 2.2). Akciğerler iki primer bronştan meydana gelmektedir. Bronşlar küçülerek bronşiyol olarak adlandırılan yapıları meydana getirmektedir. Bronşiyoller silyalı kübik epitel hücre, silyasız Clara hücresi, fırçamsı kenarlı Brush hücreleri ve küçük granüler hücreler olmak üzere 4 adet hücre tipini içermektedir. Akciğerler kan damarlarıyla beslenerek hem hava yollarını beslemekte hem de gaz değişimini sağlamaktadır (Arıncı ve Elhan, 2006; Rock ve diğerleri, 2009; Stocks ve Hislop, 2002).



Şekil 2.1. Akciğerler ve solunum sistemi (Centers for Disease Control and Prevention, 2023).



Şekil 2.2. Sağ akciğer (A) ve sol akciğerin (B) iç kısmında görünümü (Kılıç, 2011).

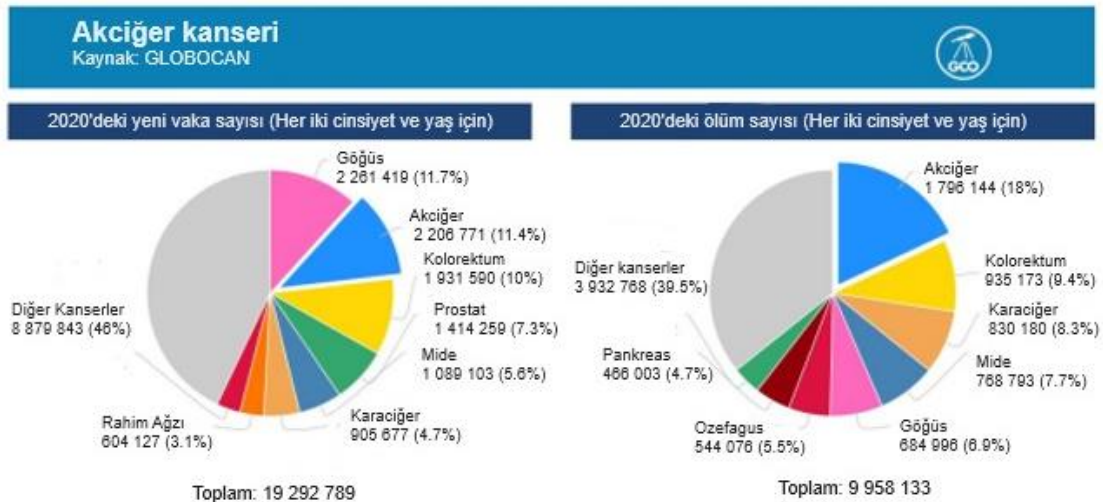
Akciğer kanseri heterojen ve agresif fenotip gösteren, 1 yıllık göreceli sağkalım oranı yaklaşık %22 olan bir kanser türüdür (Tatsui ve diğerleri, 2009). Tüm kanserler gibi akciğer kanseri de vücudun temel yaşam birimi olan hücredeki anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Hücre büyümesi üzerindeki kontrol ve denge sisteminin bozulması, kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmakta ve bunun sonucunda bir tümör kitlesi meydana gelmektedir. Bu kontrolsüz çoğalma, hücrelerin dokularda birikmesine ve akciğer dışındaki organlara (karaciğer, kemik, beyin) metastaz yapmasına neden olmaktadır (Falk ve Williams, 2010).

Akciğer kanserleri, akciğerin herhangi bir kısmında ortaya çıkabilmekte ve gelişebilmektedir. Tüm akciğer kanserlerinin %90-95'inin solunum yollarını kaplayan hücreler (bronşlar ve bronşiyoller) olan epitelial hücrelerden kaynaklandığına inanılmaktadır; bu nedenle akciğer kanserlerine bazen bronkojenik karsinomlar da denilmektedir. Ayrıca akciğer kanserleri plevradan ve nadiren akciğerlerin içinde bulunan kan damarları gibi destekleyici dokulardan da kaynaklanabilmektedir (National Research Council, 1991).

### **2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi**

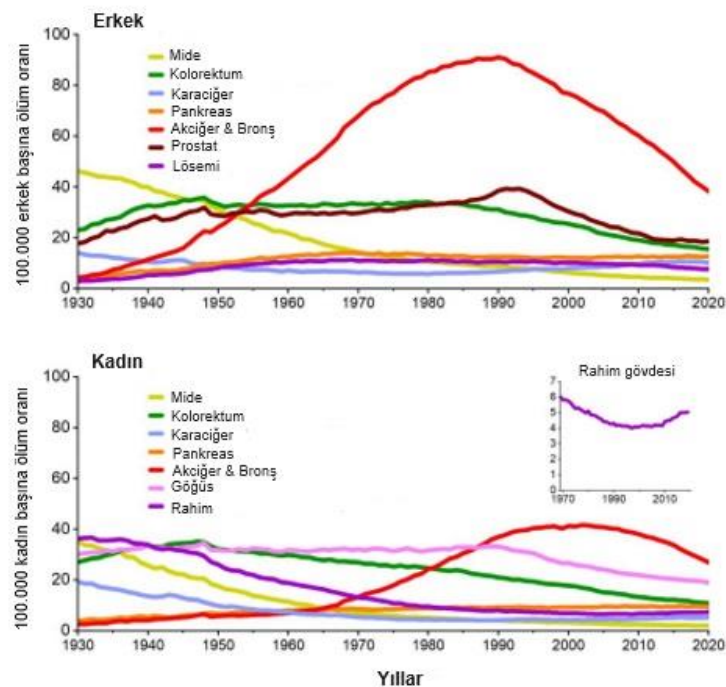
Dünya çapında en sık teşhis edilen kanser olan akciğer kanseri, toplam kanser vakalarının %11,6'lık bir insidans oranı ve toplam kansere bağlı ölümlerin %18,4'lük ölüm oranı ile şu anda tüm erkek ve kadın popülasyonlarında en yaygın ve en ölümcül malignite olarak bilinmektedir. Ölüm oranı kolon, meme ve pankreas kanserinin toplamını aşmaktadır. Akciğer kanseri nedeniyle dünya çapında her yıl yaklaşık 1,3 milyon insan ölmektedir (Bade ve Dela Cruz, 2020; Siegel, Miller ve Jemal, 2019).

Küresel Kanser Gözlemevi (GCO)'nin GLOBOCAN 2020 veritabanına göre 2020 yılında 2.206.771 kişiye akciğer kanseri tanısı konulmuş ve 1.796.144 kişi akciğer kanseri nedeniyle vefat etmiştir (Şekil 2.3) (GLOBOCAN, 2020). 2023 yılında kanserden kaynaklı en fazla mortalitenin; erkeklerde akciğer, prostat ve kolorektum kanserlerinden, kadınlarda ise akciğer, meme ve kolorektum kanserlerinden kaynaklanacağı tahmin edilmektedir (Siegel ve diğerleri, 2023).



Şekil 2.3. GLOBOCAN 2020 verilerine göre akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi (GLOBOCAN, 2020).

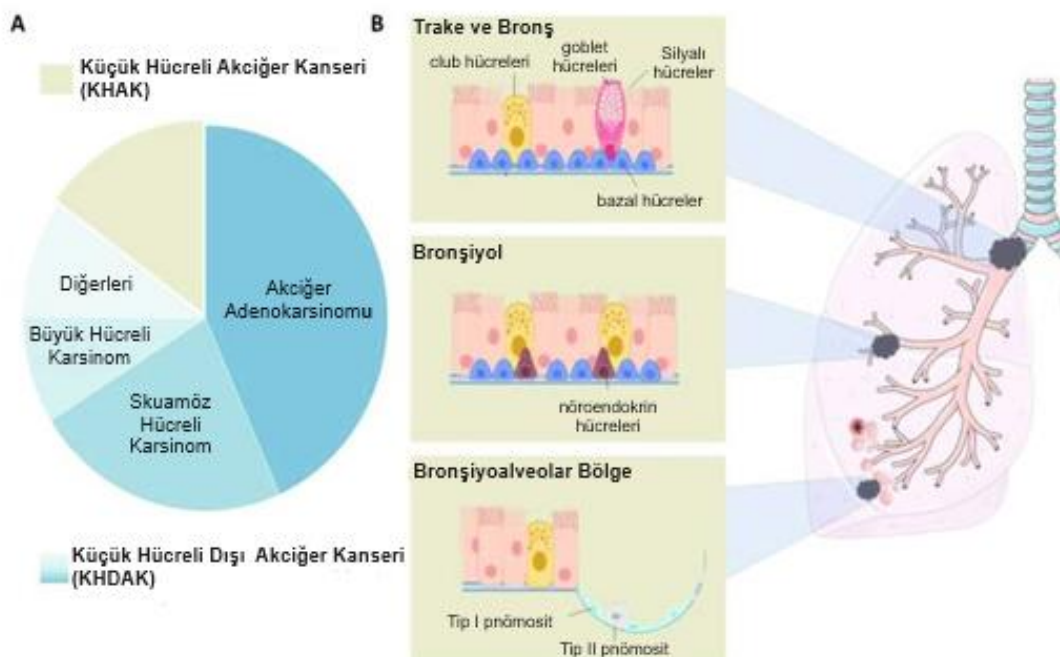
20. yüzyılda tütün kullanımının artmasının bir sonucu olarak erkekler arasında akciğer kanseri ölümlerindeki hızlı artış; kanserden ölüm oranını büyük ölçüde arttırmıştır. Bununla birlikte, sigara kullanımındaki azalmanın yanı sıra kanserlerin erken teşhisi ve tedavisindeki gelişmeler sayesinde akciğer kanseri ölüm oranı erkeklerde 1990'dan 2020'ye %58, kadınlarda ise 2002'den 2020'ye %36 azalmıştır (Şekil 2.4). 2023 yılında akciğer kanserinden kaynaklanan 127.070 ölümün yaklaşık %81'inin doğrudan sigara içmekten, %2,8'inin ise pasif içicilikten kaynaklanacağı düşünülmektedir (Siegel ve diğerleri, 2023).



Şekil 2.4. Erkek ve kadınlarda kanser mortalitesi oranları, Amerika Birleşik Devletleri, 1930–2020 (Siegel ve diğerleri, 2023).

## 2.1.2 Akciğer Kanseri Histolojisi

Akciğer kanseri, histoloji, prevalans, biyolojik davranış, prognoz ve tedaviye yanıt açısından farklı olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere iki ana alt tipe ayrılmaktadır (Dela Cruz, Tanoue ve Matthay, 2011). KHAK, kanser ölümlerinin beşinci önde gelen nedeni olmakla birlikte akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini temsil etmektedir (Vallières ve diğerleri, 2009). Genel olarak KHAK, daha yüksek oranda nükleer/sitoplazmik, ince granüler nükleer kromatin içermektedir. Nükleolus yoktur ve ortak iç şeklinde yapıya sahiptir (Travis, 2014). Nöroendokrin (NE) hücrelerden köken alan KHAK, kemoterapi ve radyasyona direnç, agresif proliferasyon ve yüksek metastaz oranıyla karakterize edilmektedir (Şekil 2.5) (Dowell, 2010; Mak, Li ve Minchom, 2019; Travis, 2011).



Şekil 2.5. Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması (Camargo Barros-Filho ve diğerleri, 2019).

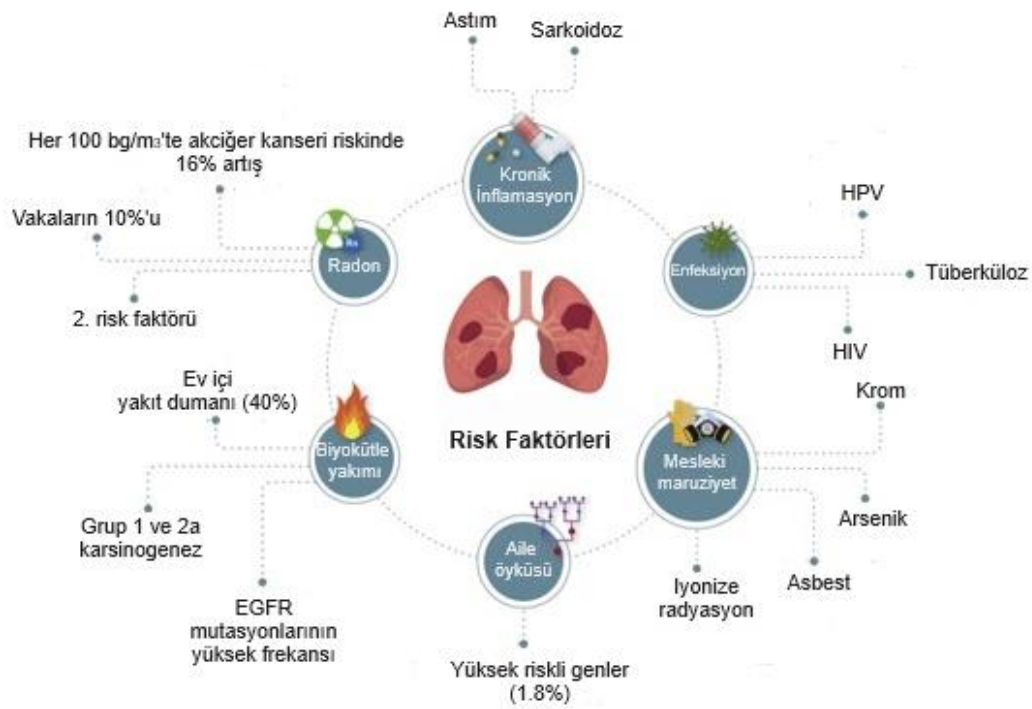
KHDAK %85'lik insidansı ile akciğer kanserinin en yaygın türüdür. KHDAK, büyük hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve diğer daha az farklılaşmış varyantlar dahil olmak üzere birkaç alt tipten meydana gelmektedir (Goldstraw ve diğerleri, 2011). Adenokarsinom yaklaşık %40 oran ile en yaygın KHDAK tipidir (Akkoçlu, 2006; Travis, Brambilla, Burke, Marx ve Nicholson, 2015).

Bronş epitelinin müsin salgılayan bezleri olan glandüler epitel, kulüp (Clara) hücreleri, akciğer periferindeki tip II pnömositlerden veya daha nadiren bronkoalveoler epitelden köken almaktadırlar (Pikor, Ramnarine, Lam ve Lam, 2013).

KHDAK hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı sadece %15'tir (Q. Zhang ve Xu, 2022). Klinik olarak, KHDAK hastalarının yalnızca az bir kısmına, tümörün cerrahi rezeksiyonla tedavi edilebildiği erken aşamada (evre I veya II) teşhis konulabilmektedir (Travis ve diğerleri, 2015). Akciğer kanseri hastalarının %60'ından fazlası tanı anında lokal olarak ilerlemiş veya metastatik hastalıkla (evre III veya IV) başvurmaktadır. Bu noktada cerrahi rezeksiyon kullanılamamaktadır (Osmani, Askin, Gabrielson ve Li, 2018).

### 2.1.3. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri

Akciğer kanseri heterojen bir hastalık olmakla birlikte çok sayıda risk faktörüyle meydana gelebilmektedir. Amerika Akciğer Kanseri Vakfı (LCFA), en önemli 9 risk faktörünü sigara, ikinci el dumana maruz kalma, radon gazına maruz kalma, asbeste maruz kalma, radyoaktif cevherler, arsenik ve berilyum dahil diğer kanserojenlere maruz kalma, yüksek arsenik seviyelerine sahip su tüketimi, hava kirliliği, akciğerlerin radyasyona maruz kalması ve genetik yatkınlık olarak tanımlamaktadır (Şekil 2.6) (Akhurst, 2018; <https://bit.ly/3lRm2Vi>, 2022; Inamura, 2017).



Şekil 2.6. Akciğer kanseri risk faktörlerinin şematik gösterimi (Corrales ve diğerleri, 2020).

Hava kirliliği gibi çevresel faktörlerin yanı sıra fiziksel aktivite, beslenme alışkanlıkları gibi diğer faktörler de akciğer kanserinin gelişimine katkıda bulunmaktadır (Dai ve diğerleri, 2019; Hamra ve diğerleri, 2014). Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) ve astım gibi çeşitli akciğer hastalığı geçiren insanların akciğer kanserine yakalanma olasılığının daha yüksek olduğunu gösterilmiştir (Hvidtfeldt ve diğerleri, 2021; Park ve diğerleri, 2020).

**Sigara kullanımı** akciğer kanseri için en yaygın risk faktörü olarak bilinmektedir ve akciğer kanserinin tüm histolojik tipleri ile ilişkilidir. Bu faktörler, akciğer kanserinin oluşumunda tek başına veya sigara kullanımı ile etki gösterebilmektedir (Khuder, 2001). Hayatı boyunca hiç sigara içmeyenlere kıyasla, sigara içenlerin akciğer kanserine yakalanma riskinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Szabo, Mao, Lam, Reid ve Keith, 2013). Bununla birlikte sigara içilmemesi durumunda akciğer kanseri vakalarının %63,73 gibi önemli bir oranda önlenebileceği bildirilmiştir (X. Wang ve diğerleri, 2022). Elektronik sigaranın uzun vadeli etkileri şu anda bilinmemektedir ancak yapılan bir çalışmada elektronik sigaraya maruz kalan farelerde, kontrol havasına maruz kalan farelere kıyasla akciğer adenokarsinomlarının gelişmeye daha yatkın olduğu gözlemlenmiştir (Tang ve diğerleri, 2019).

**Radon maruziyeti**, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (US EPA) tarafından sigara içmeyenler arasında akciğer kanserinin bir numaralı nedeni olarak gösterilmektedir (United States Environmental Protection Agency, 2023). Canlı organizmaların maruz kaldığı doğal radyasyon maruziyeti kaynaklarının büyük bir kısmını (%54) radon gazı oluşturmaktadır (Sextro, 1994). İnsan sağlığı açısından kritik endişe, radonun solunabilmesi ve daha sonra solunum yolu içindeki mukoza zarlarına yapışabilmesi gerçeğinden kaynaklanmaktadır. İnsan vücudunun sınırları içinde radon atomları,  $\alpha$  (alfa) radyasyonu olarak bilinen bir radyasyon biçimi yayarak radyoaktif bozunmaya maruz kalmaktadır. Bu  $\alpha$  radyasyon, DNA'da mutasyon oluşturmakta ve akciğer hücrelerine zarar vermektedir. Uzun süreli  $\alpha$  radyasyonu maruziyeti kanser gelişimiyle sonuçlanabilmektedir (Robertson, Allen, Laney ve Curnow, 2013).

Farklı kökenlerden kaynaklanan mesleki maruziyetler, dünya çapında akciğer kanserinin 3. nedenini oluşturmaktadır ve vakaların %5-10'unda bir ilişki bulunmuştur. Asbest maruziyeti şu anda mesleki maruziyetler arasında en önemlisi olarak bildirilmiştir. Asbeste maruz kalma, akciğer kanseri riskinin beş kat artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Alberg, Brock, Ford, Samet ve Spivack, 2013; de Groot, Wu, Carter ve Munden, 2018). **Asbest maruziyetinin** akciğer kanseri riskinin yanı sıra mortaliteyi de arttırmaktadır. Bununla birlikte sigara içmeyenlerde asbest maruziyetinin akciğer kanseri riskini 3,6 kat arttırdığı rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, asbest maruziyetinin hem sigara içen hem de sigara içmeyen vakalarda akciğer kanserinden ölüm riskini iki katına çıkardığı gözlemlenmiştir (P. N. Lee, 2001; Markowitz, Levin, Miller ve Morabia, 2013).

İnsanlar için toksik olan ve olumsuz etkilere yol açan **arseniğe maruz kalma**, akciğer kanseri malignitelere neden olmaktadır (Wei, Zhang ve Tao, 2019). DNA hasarına ve DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklere neden olabilmektedir (Kojima ve diğerleri, 2009; Konkel, 2015). Hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre döngüsü yolları gibi belirleyici sinyal yollarını düzenleyerek karsinogenezi indüklemektedir (Medda, De ve Maiti, 2021).

**Ev içi yakıt dumanı** yalnızca akciğer kanseri için önemli bir risk faktörü olmakla kalmayıp, aynı zamanda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), tarafından rapor edildiği üzere belirli bir risk faktörüne atfedilen ölümlerin küresel olarak 10'uncu nedenini olarak bildirilmiştir. DSÖ dünya çapında tüm hanelerin yaklaşık %40'ının ve kırsal hanelerin %90'ının yemek pişirmek veya ısınmak için katı yakıt kullandığını tahmin etmektedir; bu da yaklaşık 3 milyar insana karşılık gelmektedir. Bu sorun, düşük gelirli ülkelerle belirgin biçimde daha alakalıdır (Balmes, 2019; Desai, Mehta, Smith ve World Health Organization, 2004). Evsel yakıt, yanma sırasında duman açığa çıkartmakta, bu da iç mekan hava kirliliğini ve dolayısıyla partikül maddeye maruz kalmayı arttırmaktadır. Asya'da pek çok ülke evsel yakıt olarak kömür yakmaktadır ve bu uygulamanın yapıldığı bilinen belirli bölgelerdeki yüksek akciğer kanseri vakasının olası bir nedeni olarak evsel yakıt kullanımı öne sürülmektedir (Downward ve diğerleri, 2017).

**Enfeksiyonlara** bağlı sekonder kronik inflamasyonun karsinogenez ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Kronik enfeksiyonlar arasında, hücre içi patojen *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu akciğer tüberkülozunun, sigara içilmesi durumuna bakılmaksızın ve önemli bir gecikme süresiyle akciğer kanseri riskini sürekli olarak arttırdığı gösterilmiştir (Brenner, McLaughlin ve Hung, 2011).

Akciğer kanseri, HIV'i (İnsan bağışıklık eksikliği virüsü) pozitif kişilerde AIDS (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu) tanımlamayan en yaygın malignitedir ve antiretroviral tedavi zamanlarında kanser ölümlerinin önde gelen nedeni haline gelmiştir (Hernández-Ramírez, Shiels, Dubrow ve Engels, 2017). HIV pozitif popülasyonda, hastaların sigara içme durumundan bağımsız olarak akciğer kanseri riskinde artış vardır (de Groot ve diğerleri, 2018). HPV (İnsan Papilloma Virüsü) deoksiribonükleik asit (DNA), akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %20'sinde tespit edilmektedir (Bae ve Kim, 2015). Latin Amerika popülasyonunda yapılan bir çalışmada, 132 akciğer adenokarsinomu hastası, HPV16 açısından değerlendirilmiştir. Ağırlıklı olarak kadınlar olmak üzere hastaların %39'unda HPV16 enfeksiyonu pozitif olduğu tespit edilmiştir (Cardona ve diğerleri, 2013). Enfeksiyöz ajanlardan, en yaygın insan patojenlerinden biri olan *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun akciğer kanseri riskini önemli ölçüde artırabildiği gösterilmiştir (Deng, Li, Zhang, Bai ve Yang, 2013).

**İnflamatuvar hastalıklar** da akciğer kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. En yaygın akciğer hastalıklarından biri olan astım bu bağlamda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu durum akciğerlerde kronik inflamasyonla kendini gösterir ve çalışmalar astım ile akciğer kanseri riski arasında bir ilişki bulmuştur. Qu ve ark., astımın akciğer kanseri riskinin artmasıyla anlamlı derecede ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (Qu ve diğerleri, 2017).

Akciğer kanseri moleküler patogenezi oldukça karmaşık olup, tüm tümörler içerisinde genetik bozuklukların en fazla olduğu kanser türü olarak bilinmektedir. Akciğer kanserinde en yaygın mutasyona uğrayan onkogenler KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA ve MET'dir. Bu genler kanserin öngörücü ve prognostik göstergeleri olarak kabul edilmektedir (Cappuzzo ve diğerleri, 2005; Carper ve Claudio, 2015; Vogelstein ve diğerleri, 2013). Örneğin, EGFR sinyalinin downregüle olması temel olarak proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz artışıyla birlikte apoptozun azalmasına neden olmaktadır (da Cunha Santos, Shepherd ve Tsao, 2011).

#### 2.1.4. Akciğer Kanserinde Evreleme

Prognoz üzerinde büyük etkisi olan çeşitli faktörlere dayanarak akciğer kanserini evrelemek önemlidir. Tümörün evrelendirilmesi prognoz ve tedavi seçimi üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Birliği (IASLC), göğüs kanserinin sınıflandırılmasına ilişkin veriye dayalı kanıtların birincil kaynağı olarak kabul edilmektedir ve zaman içinde genişleyen sağkalım veri tabanına dayanarak çok sayıda revizyon yapmıştır (Rami-Porta ve diğerleri, 2015).

TNM evreleme sisteminin T faktörü, tümör boyutu, tümör invazyonu ve primer tümörün konumundan oluşmaktadır. N ilgili lenf nodlarının yapısal konumunu, M ise kanserin metastaz yapıp yapmadığını ifade etmektedir (Asamura ve diğerleri, 2015; El-Sherief ve diğerleri, 2014; Rami-Porta ve diğerleri, 2015).

**Tablo 2.1.** Akciğer Kanseri TNM Evrelemesi (Çok, 2018).

T faktörü tanımlayıcıları		
Tx		Primer tümörün değerlendirilemediği veya balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında malign hücrelerin gösterildiği ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile saptanamadığı durumlar
T0		Primer tümör kanıtı yok
Tis		Karsinoma in situ <sup>1</sup>
T1		Ana bronş tutulumu olmadan akciğer veya visseral plevra ile çevrili, en geniş çapı $\leq 3$ , bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimalde invazyon bulgusu olmayan tümör <sup>2</sup>
	T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom <sup>3</sup>
	T1a	Tümörün en geniş çapı $\leq 1$ cm
	T1b	Tümörün en geniş çapı $>1$ cm, $\leq 2$ cm
	T1c	Tümörün en geniş çapı $>2$ cm, $\leq 3$ cm
T2		Tümörün en geniş çapı $>3$ cm, $\leq 5$ cm veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör <sup>4</sup> *Karinayı invaze etmeden, karinaya uzaklığına bakılmaksızın ana bronşu tutan tümör *Visseral plevra invazyonu *Hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstrüktif pnömoni (kısmi veya total atelektazi/pnömoni)
	T2a	Tümörün en geniş çapı $>3$ cm, $\leq 4$ cm
	T2b	Tümörün en geniş çapı $>4$ cm, $\leq 5$ cm

T3		Primer tümörle aynı lobda metastatik nodül/ nodüller Tümörün en geniş çapı $>5- \leq 7$ cm veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon varlığı: *Göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, pariyetal perikard)
T4		Tümörün en geniş çapı $>7$ cm veya aşağıdaki yapılardan birine invazyon varlığı: *Diyafagma, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra korpusu, karina Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül/nodüller
<p><sup>1</sup>Tis adenokarsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinoma in situyu kapsar</p> <p><sup>2</sup>Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör yayımı da T1a olarak sınıflandırılır</p> <p><sup>3</sup>Soliter adenokarsinom (3 cm'den daha büyük boyutta olmayan), lepidik baskın paternli ve herhangi bir odakta 5 mm'den daha büyük boyutta invazyona sahip olmayan <sup>4</sup>Bu özellikleri ile T2 tümör; eğer <math>\leq 4</math> cm veya büyüklüğü belirlenemiyor ise T2a; eğer <math>&gt;4</math> cm fakat <math>\leq 5</math> cm ise T2b olarak sınıflandırılır</p>		

N faktörü tanımlayıcıları	
Nx	Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1	İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine ve/veya intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon
N2	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklaviküler lenf bezlerine metastaz

M faktörü tanımlayıcıları	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
M1a	Karşı akciğerde metastatik nodülnodüller, plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon <sup>1</sup>
M1b	Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz <sup>2</sup>
M1c	Bir veya birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz
<p><sup>1</sup>Akciğer kanseriyle birlikte olan plevral-perikardiyal efüzyonlar genellikle tümöre bağlı gelişir. Ancak bazen patolojik incelemelerde plevral-perikardiyal sıvıda tümör görülmemektedir. Bu bulgular varsa ve</p>	

klirik değerlendirme efüzyonun tümörle ilgili olmadığı yönünde ise efüzyon evreleme belirleyicisi olarak kullanılmamalıdır

<sup>2</sup>Bu durum bölgesel olmayan tek bir uzak lenf bezi metastazını da kapsamaktadır

### 2.1.5. Akciğer Kanserinde Belirti ve Bulgular

Akciğer kanseri vakalarında en sık görülen semptomlar öksürük, yorgunluk, nefes darlığı, göğüs ağrısı, kilo kaybı, inatçı enfeksiyon ve hemoptizidir. Hemoptizi akciğer kanserlerinin yalnızca beşte birlik kısmında görülmektedir (Shim, Brindle, Simon ve George, 2014). İskelet ağrısı ve nörolojik bulgularla ilişkili semptomlar metastatik tutulum ile ilişkilidir. Bununla birlikte akciğer kanserinin erken belirtileri, sağlıklı bireylerde dahi hiçbir zaman spesifik değildir ve eşlik eden bir hastalığın mevcut olması durumunda bunları tespit etmek inanılmaz derecede zor hale gelmektedir (Buccheri, 2004).

### 2.1.6. Akciğer Kanserinde Teşhis ve Tedavi

Akciğer kanserinin oluşumu ve ilerlemesi karmaşıktır ve birkaç adımdan meydana gelmektedir. Genellikle akciğer kanseri vakalarının çoğuna geç evrelerde teşhis konulmaktadır ve sağkalım oranları zayıftır. Akciğer kanserinde evreleme, kanserin metastazına veya bölgesel olup olmamasına dayanmaktadır. Akciğerler tümör kitlesine göre oldukça büyük olduğu için tümör belirli bir boyuta ulaşınca kadar fark edilmemektedir. Bu nedenle, akciğer kanserini erken evrelerde (Evre I ve II) teşhis etmek oldukça zordur (Coşkun ve Dabak, 2019; Langer, Besse, Gualberto, Brambilla ve Soria, 2010; Yılmaz ve diğerleri, 2011).

Akciğer kanserinin erken teşhis oranı yaklaşık %15'tir ve hastaların %75'ine lokal ileri veya metastatik aşamada tanı konulmaktadır (Jacobsen ve diğerleri, 2017). KHDAK vakalarının %30-40'ı evre IV'tür. Klinik olarak, DSÖ kriterlerine göre akciğer kanserinin 1. evresinde tümör hücreleri akciğerde yer alır fakat henüz herhangi bir lenf noduna yayılmamıştır. 2. evresinde tümör hücreleri akciğer içindeki lenf bezlerine yayılmıştır, 3. evreye geçildiğinde tümör hücreleri göğsün ortasındaki lenf düğümlerine yayılmıştır ve 4. evrede tümör hücreleri uzak organlara metastaz yapmaktadır (Akhurst, 2018; Inamura, 2017).

Akciğer kanserinde erken teşhis etkili tedavinin temel taşıdır. Mevcut tedaviler arasında cerrahi rezeksiyon, radyofrekans ablasyonu, kemoterapi hedefli tedaviler, radyoterapi, immünoterapi ve palyatif tedavi yer almaktadır (Früh ve diğerleri, 2013; Postmus ve diğerleri, 2017).

Erken evre KHDAK tedavisinde genellikle cerrahi rezeksiyon kullanılmaktadır. Ne yazık ki, akciğer kanserlerinin çoğu ileri bir evrede teşhis edildiği için ileri evrelerdeki KHDAK için birinci basamak kemoterapidir. Genellikle ileri evre kanserli hastalarda tümörlerin cerrahi olarak çıkarılmasını takiben, kemoterapi uygulanmaktadır. Ancak kemoterapiye yanıt oranı %30'un altındadır. Ayrıca çoğu kemoterapötik ilaç hem kanser hem de normal hücrelerde sistemik sitotoksisteye ve ciddi yan etkilere neden olmaktadır (Antonicelli ve diğerleri, 2013; A. Z. Wang, Langer ve Farokhzad, 2012; Zarogoulidis ve diğerleri, 2013). Bu yüzden, yeni terapötik hedeflerin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç artmaktadır (Ramalingam, Varunkumar, Ravikumar ve Rajaram, 2018). Çeşitli mutasyon aktivasyonlarında önemli bir rol oynayan epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) hedefleyen terapiler ve ROS proto-onkogen 1'in (ROS1) yeniden düzenlemesi gibi akciğer kanseri tedavileri olmasına rağmen, akciğer kanseri hastalarının sağkalım oranı hala düşüktür. Tedavinin etkinliği geç tanı ve mevcut tedavi rejimlerinin düşük yanıt vermesi nedeniyle hala sınırlıdır (Arbour ve Riely, 2019; Cuneo, Nyati, Ray ve Lawrence, 2015; C. Lee ve diğerleri, 2017).

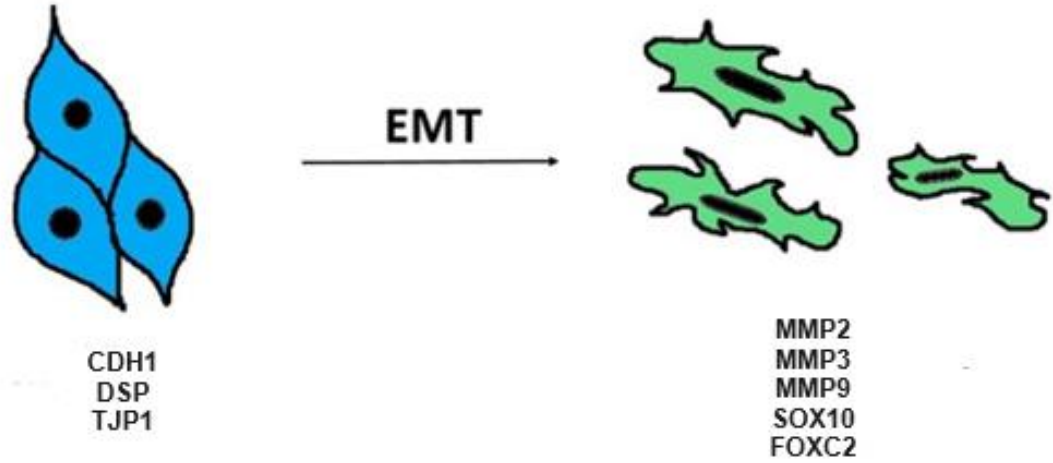
Günümüzde akciğer kanseri tarama yöntemleri başlıca akciğer röntgeni, düşük doz bilgisayarlı tomografi, balgam eksfoliyatif sitolojisi, bronkoskopi ve akciğer biyopsisini içermektedir. Göğüs röntgeni incelemesi, yüksek düzeyde yanlış negatiflik ve hastalığın erişilebilir gecikmesi nedeniyle erken akciğer lezyonlarını tam olarak gösterememektedir (Hoffman ve Sanchez, 2017; Latimer, 2018). Akciğer kanseri şüphesi olan hastaların tanısında birincil yöntem olan bronkoskopi, birçok komplikasyonu olan bir tanı ve tedavi yöntemidir (Gharsalli ve diğerleri, 2018). Akciğer dokusu biyopsisi için gereken örnek doku içindeki heterojenlik, tespitin doğruluğunu önemli ölçüde etkileyebilmektedir (de Margerie-Mellon, de Bazelaire ve de Kerviler, 2016; Tomic, Podgaetz, Andrade ve Dincer, 2015). Balgam eksfoliyatif sitolojisinin basit, hızlı, ekonomik, pratik ve özgüllüğünün yüksek olması avantajlarının yanısıra duyarlılığı düşüktür. Ancak akciğer kanserine erken tanı koyma da araçlarının mükemmel özgüllükte bulunması ve duyarlılığının oldukça yüksek olmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Kemp, Reinders ve Turic, 2007; Schreiber ve McCrory, 2003). Düşük doz bilgisayarlı tomografi, radyasyona maruz kalma riski taşıyan akciğer lezyonlarını tespit etmede yüksek duyarlılığa sahiptir. Erken akciğer kanseri taramasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Detterbeck, Mazzone, Naidich ve Bach, 2013).

### 2.1.7. Akciğer Kanseri ve Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT)

Epitel hücrelerinin mezenkimal özellikler kazanma ve epitelyal özelliklerini azaltma yeteneği ilk olarak Elizabeth Hay tarafından gözlemlenmiştir (Hay, 1995). Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), embriyogenez, gastrulasyon, kalp gelişimi ve yara iyileşmesi için gerekli olan evrimsel olarak korunmuş bir programdır (Xiao ve He, 2010). EMT, epitel hücrelerinin transkripsiyonel olarak yeniden programlandığı, yapışmanın azalmasına, migrasyon ve invazyonun artmasına neden olan bir süreçtir. Bu süreç, spesifik transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir panel tarafından indüklenmektedir. Bununla birlikte, kanserin ilerlemesi sırasında EMT'nin, metastazda ve ilaç direncinde rol oynadığı, birçok tümörün ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gheldof ve Berx, 2013; Xiao ve He, 2010).

Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 olmak üzere üç tip EMT tanımlanmıştır. Tip 1, EMT spesifik olarak embriyonik gelişimiyle ilişkilidir (Chaffer, Thompson ve Williams, 2007). Tip 2 EMT, hücreleri EMT'ye girmeye teşvik etmek için bağımsızlık hücreleri tarafından salınan sitokinler ve proinflamatuvar faktörlerin aracılık ettiği yara iyileşmesi ile ilişkilidir (K. K. Kim ve diğerleri, 2006; Zeisberg ve diğerleri, 2007). Tip 3 EMT ise epitel hücrelerinin metastaz için gerekli olan temel mezenkimal fenotip özelliklerini kazandığı onkogenik EMT tipidir (Thiery, 2002).

EMT'nin ana özelliği epitelyal hücrelerden hareketli, invazif ve migrasyona yatkın olan mezenkimal hücrelere dönüşümün gerçekleştirilmesidir. Bu süreçte epitel hücreleri hücre-hücre adezyonu ve hücre polaritesini kaybetmekte, E-kadherin gibi epitelyal hücre belirteçlerinin ekspresyonunu azaltıp, Vimentin, Fibronektin, N-kadherin, alfa-düz kas aktin ( $\alpha$ -SMA) gibi mezenkimal hücre belirteçlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bununla birlikte istilacı fenotiple ilişkili MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 gibi matriks metaloproteinazların (MMP'ler) aktivitesini arttırmaktadır (Şekil 2.7) (Thiery ve Sleeman, 2006). Böylece kanser hücreleri çevredeki stromaya göç etme ve istila etme ve daha sonra kan ve lenf damarları yoluyla uzak bölgelere yayılma kapasitesi kazanmaktadır (Xiao ve He, 2010).



**Şekil 2.7.** EMT'nin 8 kanonik gen belirteci (Chae ve diğerleri, 2018). 8 kanonik genin 3'ü 'epitelyal' ve 5'i 'mezenkimal' genden oluşmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, E-cadherinden N-cadherine geçiş, prostat kanseri ilerlemesi ile güçlü ve anlamlı ilişkiler gösterdiği bildirilmiştir (Gravdal, Halvorsen, Haukaas ve Akslen, 2007). MMP2'nin aşırı ekspresyonunun, akciğer kanseri de dahil olmak üzere farklı kanser türlerinin ilerlemesi, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Chowdhury, 2016; Merchant ve diğerleri, 2017). Bununla birlikte bir tümör baskılayıcı gen olarak TIMP2, MMP ekspresyonunu bloke ederek hücre büyümesini ve invazyonunu inhibe etmektedir (Kurzawski ve diğerleri, 2017; Tjomsland ve diğerleri, 2016). TIMP2, MMP'leri etkisiz hale getirmek için MMP'lere bağlanır ve hücre dışı matriksi MMP'ler tarafından bozulma ve yeniden yapılanmadan korur, böylece tümör hücresi invazyonunu engellemektedir (Kiani ve diğerleri, 2020; Vira ve diğerleri, 2020).

Çeşitli çalışmalar E-kadherin ekspresyonu kaybı ile akciğer kanserinde kötü prognoz arasındaki ilişkiyi kanıtlamıştır. EMT ile ilgili proteinlerin (E-kadherin, N-kadherin, Vimentin, İntegrin ve MMP-9) sıklıkla primer skuamöz hücreli karsinom ve akciğer adenokarsinomunda eksprese edildiği ve akciğer tümörü beyin metastazlarında EMT fenotipi özellikleri gözlemlenmiştir. Ancak EMT ile akciğer kanserinin ilerlemesi veya prognostik önemi arasındaki korelasyon hala tartışmalıdır (Chae ve diğerleri, 2018; Karacosta ve diğerleri, 2019; Prudkin ve diğerleri, 2009).

## 2.2. Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptörler (PPAR)

Kromozom 3p25 üzerine lokalize olan Peroksizom Proliferatör ile Aktive Edilen Reseptör (PPAR); ligandla aktive transkripsiyon faktörleri olan nükleer reseptör süper ailesi arasında yer almaktadır (Arat ve diğerleri, 2020; Sertznig ve diğerleri, 2007). Glukokortikoid, D vitamini, retinoik asit reseptörleri de nükleer reseptör süper ailesi üyeleri arasında bulunmaktadır. PPAR'lar retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerler oluşturarak DNA yanıt elemanlarının işlevlerini düzenlemektedir (Blanquart, Barbier, Charles Fruchart, Staels ve Glineur, 2003; Costigan ve diğerleri, 2019). Tüm PPAR'lar lipid ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde ve enerji homeostazisinde önemli bir rol oynamaktadır (Towfighi ve Ovbiagele, 2008).

PPAR'lar, ilk olarak 1990 yılında Issemann ve Green tarafından tanımlanmıştır (Issemann ve Green, 1990). PPAR'lar, immün hastalıklar, hücre farklılaşması/gelişimi, kanser hücresi proliferasyonu, hücre sağ kalımı, apoptoz ve tümör büyümesinin düzenlenmesi gibi biyolojik olaylardaki oynadığı rollerle kanser, kardiyovasküler hastalıklar, inflamasyon ve üreme anomalileri gibi çok sayıda patolojiyle ilişkilendirilmiştir (Evans ve Mangelsdorf, 2014; Gou, Gong, Jin, Shi ve Hou, 2017; Sertznig ve diğerleri, 2007).

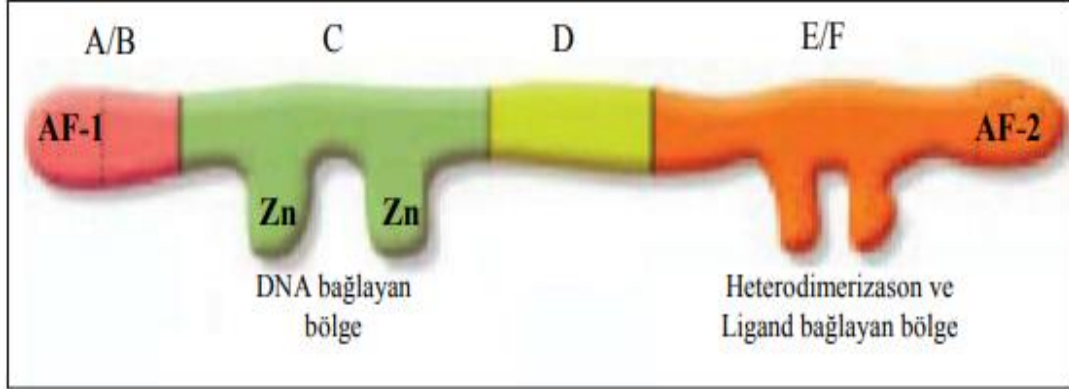
PPAR'ların endojen ligandları arasında serbest yağ asitleri, eikosanoidler ve lipidler yer almaktadır; bunlar bağlanma sonrasında lipid metabolizması, adipogenez ve insülin duyarlılığında rol oynayan spesifik hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu indüklemektedir (Akiyama, Meinke ve Berger, 2005).

### 2.2.1. PPAR'ların Yapısı

PPAR alt ailesi, ligand bağlama ve DNA bağlama alanlarında yaklaşık %60-80 homoloji paylaşan, çeşitli PPAR izoformlarını kodlayan farklı genlerden meydana gelmektedir. (Atrice, And ve Wahli, 1999).

Tüm PPAR proteinleri ve diğer nükleer reseptörleri dört ortak domainden meydana gelmektedir. Bunlar bir amino terminal bölgesi (A/B alanı), N terminalde bir DNA bağlanma bölgesi (C), bir menteşe bölgesi (D) ve C terminal bölgesinde bulunan ligand bağlanma, dimerizasyon ve trans-aktive edici alandır (E/F). Nükleer reseptör domainlerinden en değişken bölge olan A/B domaini, fosforilasyon yolu ile PPAR aktivitesinde önemli bir rol oynayan ligand bağımsız aktivasyon faktör 1'i (AF-1) içermektedir. Domain C, nükleer reseptör süper ailesi boyunca yapısal olarak korunmakta ve PPAR'lara DNA bağlanma spesifikliği kazandıran dokuz sistein içeren iki çinko

parmak motifine uygun şekilde katlanmaktadır. D domaini, C ve E/F bölgelerinin bir arada tutan esnek bir menteşe olarak görev yapmaktadır (Şekil 2.8) (Blanquart ve diğerleri, 2003; Costigan ve diğerleri, 2019; Guan ve Breyer, 2001; Marx, Duez, Fruchart ve Staels, 2004).



**Şekil 2.8.** PPAR'ların yapısal organizasyonu (Friedmann, Cooper ve Healy, 2005). A/B: Transaktivasyon ve fosforilasyon bölgesi, C: DNA bağlanma bölgesi, D: Menteşe bölgesi, E/F: Ligand bağlanma bölgesi.

PPAR'ların E/F alanı, retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerizasyonda rol oynamakla birlikte hidrofobik bir ligand bağlama cebi oluşturmaktadır. Ek olarak E/F alanı, transkripsiyonel aktivasyonu indüklemek amacıyla ligandın bağlanması için bir aktivasyon faktör 2 (AF-2) alanını içermektedir (Blanquart ve diğerleri, 2003; Tugwood ve diğerleri, 1992). C domaini, PPAR yanıt genlerinin promotör kısmındaki geniş bir gen dizisinin ekspresyonunu kontrol eden spesifik PPAR yanıt elementlerini (PPRE) tanınmasında ve heterodimerizasyon sonrası PPAR'ların DNA'ya bağlanmasında işlev görmektedir (Costigan ve diğerleri, 2019; Guan ve Breyer, 2001).

Üç PPAR izoformunun ligand bağlanma bölgeleri karşılaştırıldığında, PPAR  $\beta/\delta$ 'daki AF-2 sarmalına bitişik bölgede bulunan ligand bağlanma domaini önemli ölçüde daha dardır. Bu sebeple büyük polar başlara sahip olan ligandlar ile bağlanamamaktadır. PPAR  $\beta/\delta$  ile karşılaştırıldığında, PPAR  $\alpha$  ligand bağlanma domaini nispeten daha fazla lipofilikken, PPAR  $\gamma$  ligand bağlanma domaininin daha hidrofilik olduğu gözlemlenmiştir. Kristal yapı çalışmalarından elde edilen bilgiler, PPAR'ların ligand bağlanma cebinin, diğer nükleer reseptörlere göre çok daha büyük olduğunu ve PPAR'ların, nispeten düşük afiniteyle, değişken büyüklükteki birden fazla doğal ligandla etkileşimini mümkün kılacak şekilde evrimleştiğini ortaya koymaktadır (Berger ve Moller, 2002; Friedmann ve diğerleri, 2005).

### 2.2.2. PPAR İzofomları

PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  ve PPAR $\gamma$  olmak üzere 3 ana PPAR izoformu bulunmaktadır(X. Y. Zhang, Chen ve Guan, 2005). Tüm PPAR'lar yapısal olarak benzer olmakla birlikte dokularda farklı izoformların bulunması ve bunların değişik ligandlarla etkileşime girmesi nedeniyle farklı fizyolojik etkiler sergilemektedirler (Gilde, Fruchart ve Staels, 2006).

#### 2.2.2.1. Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilen Reseptör $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )

NR1C1 (Nükleer Reseptör Alt Ailesi 1, Grup C, Üye 1) tarafından kodlanan PPAR $\alpha$  her yerde eksprese edilmektedir. Ancak çoğunlukla diğer izoformların yanı sıra kahverengi yağ dokusu ve karaciğer gibi yüksek miktarlarda yağ asitleri sunan dokularda bulunmaktadır. Mitokondriyal ve peroksizomal yağ asitlerinin beta oksidasyon hızlarını yükseltmesinde önemli bir role sahiptir Ayrıca akciğer, plasenta, bağırsak, pankreas ve iskelet kasında da eksprese edilmektedir (L. Han, Shen, Bittner, Kraemer ve Azhar, 2017; Rigamonti, Chinetti-Gbaguidi ve Staels, 2008).

#### 2.2.2.2. Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilen Reseptör $\beta/\delta$ (PPAR $\beta/\delta$ )

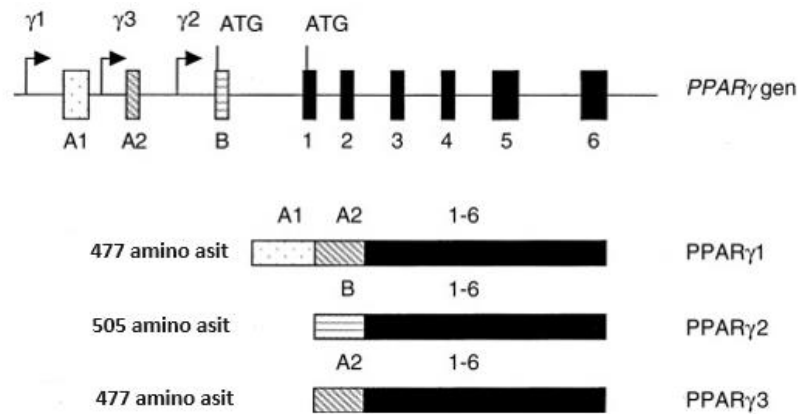
NR1C2 (Nükleer Reseptör Alt Ailesi 1, Grup C, Üye 2) tarafından kodlanan PPAR $\beta/\delta$  ise iskelet kası, adipositler, makrofajlar, akciğerler, beyin ve deri gibi birçok dokuda eksprese edilmektedir. Kas, yağ dokusu ve karaciğer gibi çeşitli dokularda düşük seviyeler bulunmaktadır. PPAR $\beta/\delta$ 'nın yağ asidi oksidasyonunun yoğunluğunun artırılmasında etkili olduğu gözlemlenmiştir (Bouwens, Afman ve Müller, 2007; L. Han ve diğerleri, 2017).

#### 2.2.2.3. Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilen Reseptör $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )

PPAR $\gamma$ , NR1C3 (Nükleer Reseptör Alt Ailesi 1, Grup C, Üye 3) tarafından kodlanmaktadır. Doku ekspresyonunda farklılıklar gösteren  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 ve  $\gamma$ 3 olmak üzere üç farklı izoforma sahiptir. Bu izoformların her biri, iyi tanımlanmış bir ekspresyon modeli, farklı doku dağılımı ve spesifik aktivite ile karakterizedir. PPAR $\gamma$  proteininin çok sayıda varyanta sahip olması bu transkripsiyon faktörünün çok geniş bir yelpazede işlev

gösterdiğine işaret etmektedir. (L. Han ve diğerleri, 2017; Jay ve Ren, 2007; Moseti, Regassa ve Kim, 2016).

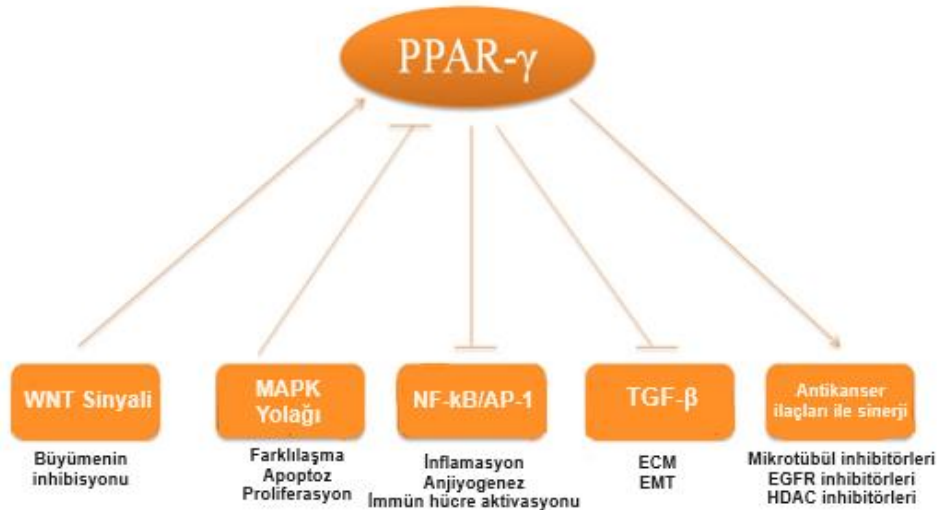
İnsanda 3p.25.2 lokalizasyonunda yerleşik olan ve 9 ekzon içeren PPAR $\gamma$  geninin transkripsiyon ürününün alternatif kesimi (splicing) sonucu üç farklı PPAR $\gamma$  transkripti meydana gelmektedir. Her PPAR $\gamma$  transkripti, yalnızca 5' ekzonlarda farklılık gösteren altı adet 3' kodlayıcı ekzonu paylaşmaktadır. PPAR $\gamma$ 1'in 5' çevrilmemiş bölgesi A1 ve A2 ekzonlarını içerirken, PPAR $\gamma$ 3 yalnızca A2 ekzonunu içermektedir. PPAR $\gamma$ 1 ve PPAR $\gamma$ 3'ü ayırt eden 5' ekzonların hiçbiri bir translasyon başlatma bölgesine sahip olmadığından, PPAR $\gamma$ 1 ve PPAR $\gamma$ 3 mRNA'ları aynı protein ürünlerine neden olmaktadır. Buna karşılık, PPAR $\gamma$ 2 ekson A2 ile ekson 1 arasında konumlanmış PPAR $\gamma$ 2 proteininde 30 ek N-terminal amino asit sağlayan,  $\gamma$ 2'ye özgü bir kodlama eksonu bulunmaktadır (Auwerx, 1999; Escher ve Wahli, 2000). Farklı promotör kullanımına bağlı olarak her PPAR $\gamma$  izoformu farklı bir ekspresyon modeline sahiptir (Şekil 2.9) (Fajas ve diğerleri, 1997; Fajas, Fruchart ve Auwerx, 1998).



**Şekil 2.9. İnsan PPAR $\gamma$  geninin genomik organizasyonu** (Guan ve Breyer, 2001). Alternatif promotör kullanımı, üç 5' ekzon A1, A2 ve B'nin eklenmesi, üç farklı transkript ve iki PPAR $\gamma$  protein ürünü (PPAR $\gamma$ 1 ve PPAR $\gamma$ 2) ile sonuçlanmaktadır. Promotör  $\gamma$ 1 ve  $\gamma$ 3 transkripsiyonu, 477 amino asitlik aynı protein (PPAR $\gamma$ 1 protein) ile sonuçlanmaktadır. PPAR $\gamma$ 1 proteini ile karşılaştırıldığında promotör  $\gamma$ 2 kullanılarak, N terminalinde ilave 30 amino asit içeren 505 amino asitlik PPAR $\gamma$ 2 proteini elde edilmektedir.

PPAR  $\gamma$ 1 kalp, kolon, retina, pankreas, böbrek ve hemapoietik hücreler gibi nerdeyse tüm hücrelerde doku ekspresyonuna sahiptir. En yüksek ekspresyon seviyeleri ise yağ dokusunda bulunmuştur. PPAR $\gamma$ 2 çoğunlukla yağ dokusunda eksprese edilirken, PPAR $\gamma$ 3 esas olarak kolon, makrofajlar ve yağ dokusunda eksprese edilmektedir. PPAR $\gamma$ 4'ün endotelial hücrelerde eksprese edildiği bulunmuştur (L. Han ve diğerleri, 2017; Jay ve Ren, 2007; Moseti ve diğerleri, 2016).

Nükleer hormon reseptörü süper ailesi üyesi PPAR $\gamma$ , lipoprotein metabolizmasının, enerji dengesinin, oksidatif stresin ve inflamatuvar sinyallemenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2.10) (Seiri, Abi ve Soukhtanloo, 2019). Peroksizom proliferatörüyle aktive olan reseptörler arasında en kapsamlı çalışılan izoform PPAR $\gamma$  olarak bilinmektedir. PPAR $\gamma$ , obezite, diyabet, ateroskleroz ve kanser gibi sayısız hastalıkta rol oynamaktadır. Birçok kanser hücresi tipinin proliferasyonunu ve apoptozunu modüle etmekte ve akciğer, meme, kolon, prostat ve mesane dahil olmak üzere birçok insan tümöründe eksprese edilmektedir. Çalışmalar, PPAR $\gamma$ 'nın bir tümör baskılayıcı olarak işlev görerek güçlü antikanser etkileri olduğunu göstermektedir. Her ne kadar PPAR $\gamma$  spesifik dokulara veya ligandlara bağlı olarak tümör gelişimini baskılasa veya teşvik etse de mekanizma hala belirsizliğini korumaktadır (Albrektsen ve diğerleri, 2002; Gou ve diğerleri, 2017; S. Han ve Roman, 2007; Remels ve diğerleri, 2009).



Şekil 2.10. PPAR $\gamma$  ve diğer sinyal yollarının karşılıklı çapraz düzenlenmesi ve etkileri (Reka, Goswami, Krishnapuram, Standiford ve Keshamouni, 2011).

Birçok kanser tipinde gösterilen PPAR $\gamma$ 'nın fosforilasyonu sonucunda transkripsiyonel aktivite ve farklılaşmayı destekleme kabiliyetinin büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Adams, Reginato, Shao, Lazar ve Chatterjee, 1997; Camp ve Tafuri, 1997). CD36, C/EBP PPRE'lere bağlanarak PPAR $\gamma$  aktivasyonunu sağlamaktadır (Zhou ve diğerleri, 2008).

CD36 seviyesi farklı hücre tiplerine göre değişiklik göstermektedir. Yumurtalık kanseri, mide kanseri, glioblastoma ve oral skuamöz hücreli karsinom hücreleri gibi malign epidermal tümör hücrelerinde CD36 ekspresyonu belirgin şekilde upregüle edilirken, tümörü destekleyen tümör mikro damarlarında gelişim ve metastazda CD36 ekspresyonu genellikle downregüle edilmektedir (Ladanyi ve diğerleri, 2018; J. Pan ve diğerleri, 2019; Pascual ve diğerleri, 2017; Zhou ve diğerleri, 2008). CD36 ekspresyonu tümör stromasında da eksiktir. Örneğin meme kanseri stromasındaki CD36 ekspresyon düzeyi, komşu dokulara göre oldukça düşüktür. Ayrıca, yüksek meme kanseri prevalansı ile ilişkili güçlü bir risk faktörü, yüksek mamografik yoğunluktur (MD) ve yüksek MD'li (fakat kanser içermeyen) dokuların da azalmış CD36 düzeyleri gösterilmiştir. Bu kanıtlar, CD36'nın eksikliğinin tümör stromasını ve yüksek kanser riskini temsil ettiğini göstermektedir. Stromadaki CD36 düzeyi ne kadar düşükse, tümör o kadar agresif hale gelmektedir (DeFilippis ve diğerleri, 2012). Yapılan bir çalışma, akciğer kanserinde CD36'nın metilasyonunun artmasıyla insan akciğer tümörlerinde CD36 ekspresyonunun azaldığını belgelemiştir (Sun ve diğerleri, 2018). Farklı bir çalışmada, ekspresyonu akciğer adenokarsinomlarında çok sayıda bağımsız yayınlanmış mikrodizi veri setini araştırılmış ve KHDAK hastalarından alınan primer tümörlerde CD36'nın farklı ve önemli ölçüde azalmış ekspresyonu tespit edilmiştir (Mamoor, 2020).

TSP-1'in yakın zamanda CD36 yoluyla vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) reseptör 2 (VEGFR2) seviyesini inhibe ettiği bulunmuştur. Mikrovasküler endotelde, CD36-TSP-1 bağlanmasından sonra, VEGF sinyal iletimini zayıflamaktadır. TSP-1 ve VEGF antagonistik bir ilişkiye girmekte ve mikrodamar oluşumunu birlikte düzenlemektedir. Böylece, CD36/TSP-1 anti-anjiyogenik sinyal, büyüme faktörünün aracılık ettiği pro-anjiyogenik yanıtı, bir anti-anjiyogenik ve pro-apoptotik yanıtı dönüştürmektedir (Chu, Ramakrishnan ve Silverstein, 2013; de Fraipont, Nicholson, Feige ve Van Meir, 2001).

PPAR $\gamma$  ligandlarının tek başına anti-kanser ilaçları olarak veya tip-1 interferonlar, Gemcitabin, Siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörleri ve Sisplatin ile yardımcı madde olarak önerilmiştir (Dicitore ve diğerleri, 2013). Yara iyileştirme tahlili kullanılarak, 6IL'nin meme kanseri hücrelerindeki anti-migrasyonal etkilerinin, PPAR $\gamma$ 'nın aşırı ekspresyonunu tetiklediği bildirilmiştir. Önerilen bu mekanizma, 6IL'nin meme kanseri tedavisinde PPAR $\gamma$ 'ya bağımlı bir mekanizma tarafından kullanılmasına yönelik destekleyici kanıtlar sağlamaktadır (Nava-Villalba, Nuñez-Anita, Bontempo ve Aceves, 2015).

Bazı seçici olmayan ve seçici COX-2 inhibitörlerinde, COX-2 enzimatik aktivitesini inhibe etme yeteneklerinden bağımsız olarak PPAR $\gamma$ 'yı aktive ettiği gösterilmiştir, ancak kesin moleküler mekanizmalar hala bilinmemektedir (Lehmann, Lenhard, Oliver, Ringold ve Kliewer, 1997).

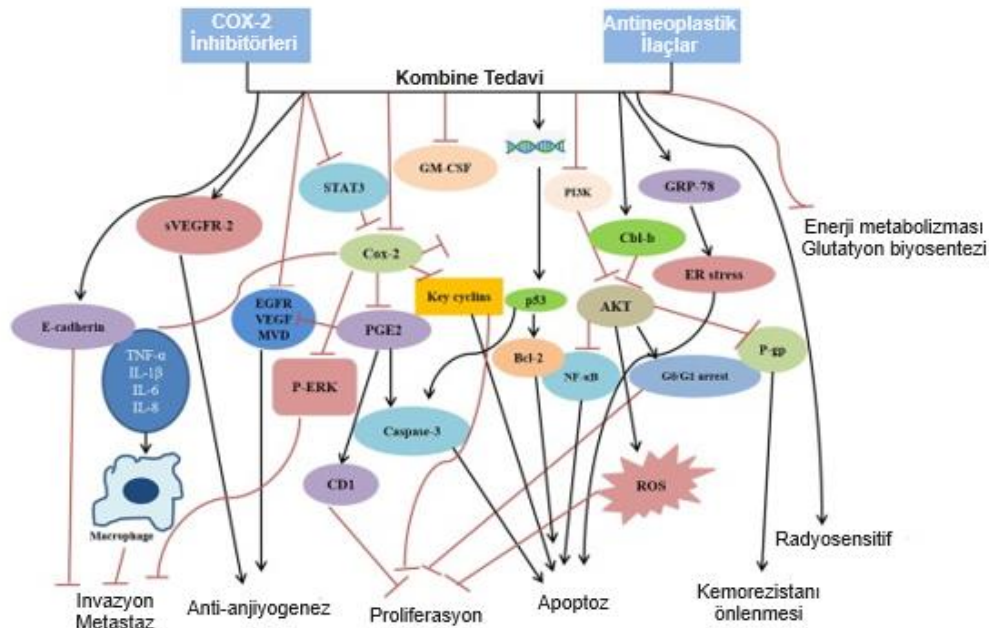
### **2.3. Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve Kanserde COX-2 İnhibitörlerinin Etkisi**

Prostaglandin (PG) endoperoksit sentazları olarak da bilinen COX , COX-1, COX-2 ve COX-3 olmak üzere 3 izoform halinde bulunmaktadır. COX-1 çoğu memeli dokusunda yapısal olarak eksprese edilir ve çeşitli fizyolojik süreçlere aracılık etmektedir. COX-2, normal dokuların çoğunda düşük düzeydedir veya tespit edilememektedir. Epitelyal hücreler, endotelyal hücreler ve makrofajlar dahil olmak üzere birçok hücre tipinde geniş bir uyaran aralığına yanıt olarak indüklenmektedir. COX-3 ise serebral korteks ve kalpte bulunan COX-1'in alternatif bir birleştirme çeşididir (Chandrasekharan ve diğerleri, 2002; Seibert ve diğerleri, 1997). COX-1 ve COX-2, insanlarla kemirgenler arasında >%60 homoloji göstermektedir. Fonksiyonel alanlar korunurken, aktif bölge ceplerinin 434 ve 523 pozisyonlarındaki birkaç önemli bölgedeki konformasyonel değişiklikler, bunların spesifik inhibitörlere karşı farklı afinite göstermelerine neden olmaktadır (Blobaum ve Marnett, 2007; Smith, DeWitt ve Garavito, 2000).

Hem COX-1 hem de COX-2'nin, bir asırdan fazla süredir inflamasyon ve ağrı tedavisinde kullanılan NSAID'ler tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (Willoughby, Moore ve Colville-Nash, 2000). Bununla birlikte, yapısal COX-1'in seçici olmayan NSAID'ler tarafından inhibisyonu, mukoza üretimi ve ülserasyonla ilişkili gastrointestinal toksisiteye ve kan akışıyla ilişkili renal toksisiteye neden olmaktadır (C. Luo, He ve Bohlin, 2005; Roughead, Ramsay, Pratt ve Gilbert, 2008). Sonuç olarak, çeşitli çalışmalar daha az gastrointestinal yan etkiye sahip COX-2 seçici inhibitörlerin (Coxibler) geliştirilmesine yol açmıştır. Coxibler, seçici olmayan NSAID'lere kıyasla daha iyi gastrointestinal güvenliği göstermektedir. Bu nedenle, Coxibler artrit, ameliyat sonrası ağrı, baş ağrılarının yanı sıra beyin ve periferik dokuların inflamatuvar hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Crofford ve diğerleri, 2000; Minghetti, 2004).

Önemli veriler COX-2 ekspresyonunun sadece bir yan ürün olmadığını, aynı zamanda tümör gelişiminin nedensel bir faktörü olduğunu göstermektedir (Wu, 2004). COX-2 enzimi genellikle meme, prostat, akciğer, böbrek, yumurtalık ve karaciğeri kapsayan epitelyal malignitelerde aşırı eksprese edilmekte ve yüksek ekspresyon sonucu daha kötü prognoz meydana gelmektedir. COX-2, peroksidaz aktivitesi yoluyla araşidonik asidin prostaglandinler ile metabolizmasında hız sınırlayıcı adımı katalize etmektedir. COX-2 ürünü, EP1-EP4 olarak adlandırılan dört G-proteinine bağlı Prostaglandin Endoperoksit 2 (PGE2) reseptörüne bağlanmaktadır (Majumder, Nandi, Omar, Ugwuagbo ve Lala, 2018; Reader, Holt ve Fulton, 2011). Araşidonik asit, hayvansal yağların önemli bir bileşenidir ve bu substrattan türetilen biyolojik olarak aktif lipitler, kronik inflamasyon ve kanserde önemli rollere sahiptir (D. Wang ve DuBois, 2010). Prostaglandinlerde birçok fizyolojik etkiye aracılık eden lipit bileşikleridir. PGE2, insan vücudunda en bol bulunan prostanoiddir ve PGE2'nin sentezi, COX-2 dahil siklooksijenaz enzimleri tarafından yürütülmektedir. Hem yüksek COX-2 ekspresyonu hem de artan PGE2 seviyeleri meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserle ilişkilendirilmiştir (Reader ve diğerleri, 2011). COX-2'nin anormal aşırı ekspresyonunun, artan PGE2 ve VEGF-A seviyelerinden kaynaklanan çoklu hücrel olaylara bağlı olarak tümör ilerlemesi, metastaz ve invazyona yol açtığı gösterilmiştir (Majumder ve diğerleri, 2018).

Hayvan tümör modellerinde, PGE2 sinyalinin steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler) veya COX-2 inhibitörleri tarafından inhibisyonunun, tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (D. Wang ve DuBois, 2010, 2018). Celecoxib gibi COX-2 inhibitörlerinin uzun süreli kullanımının çeşitli insan kanserlerinin görülme sıklığını azaltabildiğini ve ek olarak çoklu ilaç direncini önleyerek kemoterapinin etkinliğini önemli ölçüde artırabildiği bildirilmiştir (Şekil 2.11) (Harris, 2009a; Karai ve diğerleri, 2020; Xu, 2002).



**Şekil 2.11.** COX-2 inhibitörlerinin ve diğer ajanlarla kombine tedavisi sonucunda moleküler hedefleri üzerindeki etkileri (S. Li, Jiang, Wang ve Yu, 2020).

COX-2 inhibitörleriyle birlikte çeşitli antineoplastik ilaçların kullanılması kanser kontrolü ve tedavisi için umut vaat etmektedir. Bu kombinasyonlar sinerjistik antitümör etkileri göstermektedir. Gen seviyesinde, COX-2 inhibitörleri inflamatuvar faktörleri azaltabilmektedir. Böylece tümör anjiyogenezini inhibe etmek amacıyla VEGF downregüle edilmesi ve tümör hücresi apoptozunu indüklemek amacıyla PI3K/Akt sinyal yolunun inhibe edilmesi gibi etkileri ile kanser tedavisinde kullanılabilir (Perroud ve diğerleri, 2016; C.-X. Yang ve diğerleri, 2020).

#### 2.4. *Orchis Spitzelii* (Salep)

Orkideler yumrulu, pürüzsüz ve uzun yaprakları olan, beyaz, pembe, kırmızı ve mor çiçekleri olan otsu bir bitkidir (Şekil 2.12) (Gemici, Duman, Ekim ve Alagöz, 2004). Salep (toz), bazı yabancı orkidelerin (*Orchis* türü) kurutulmuş yumrularının öğütülmesiyle elde edilen beyaz renkli undur. Salebin en önemli bileşeni %16-55 oranında stabilizatör görevi gören glukomannandır. Aynı zamanda nişasta (%2,7), nem (%12) ve mineraller (%2,4) içermektedir (Tekinsen ve Karacabey, 1984). Salebin fizikokimyasal fonksiyonları, türüne göre değişen kimyasal bileşimine, özellikle de glikomannan düzeyine bağlıdır (Baytop ve Sezik, 1968; Durmuşkahya, Akyol ve Özdemir, 2015).



Şekil 2.12. a. Salep bitkisinin doğal yaşam alanı, b. Salep bitkisinin yaprak ve yumru bölümleri

Salep de diğer bitkiler gibi yüksek oranda fitokimyasal içeriğine sahiptir. Orkide fitokimyasalları genel olarak alkaloidler, flavonoidler, karotenoidler, antosiyaninler ve steroller olarak sınıflandırılır. Bunlar arasında alkaloidler ve flavonoidler biyolojik özellikleri açısından en önemli olanlardır (Bhattacharjee, 2006). Salep içeriğinde bulunan azotlu maddeler, glikoz, protein, ferolik asit, Quercetin, daucosterol, cirsiliol ve steroidler sayesinde eski zamanlardan bu yana geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmıştır (Grieve M., 1989; Lumaga, Cozzolino ve Kocyan, 2006).

Salep kanser, tüberküloz, felç, mide rahatsızlıkları, göğüs ağrısı, artrit, frengi, sarılık, kolera, egzama, basur, çıban, iltihap, adet düzensizliği, lökoderma, ishal, kas ağrısı, dizanteri, hepatit, hazımsızlık, kemik kırıkları, romatizma, astım, sıtma, kulak ağrısı, cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve yaralar gibi farklı hastalık ve rahatsızlıkların tedavisinde ilaç kaynağı olarak kullanılmıştır. (Anjum AA, Tabassum K ve Ambar S., 2019; Atashpour, Kargar Jahromi, Kargar Jahromi ve Zarei, 2017; Hossain, 2011; Jagdale, Shimpi ve Chachad, 2009; Kargar Jahromi, Pourahmad, Abedi, karimi ve Kargar Jahromi, 2018). Yapılan bir çalışmada; salep ekstraktının hepatotoksisiteye neden olmadığı ve bununla birlikte total protein ve albumin düzeyinde artış, karaciğer enzim düzeyinde ise azalmayı sağladığı bildirilmiştir. Bu nedenle salebin karaciğer hastalığı olan hastalar için faydalı bir ilaç olabileceği düşünülmektedir (Kargar Jahromi, Pourahmad ve Kargar Jahromi, 2015). İnanılmaz çeşitlilik, yüksek alkaloidler ve glikozit içeriği, orkideler üzerine yapılan araştırmaların potansiyellerle dolu olduğunu düşündürmektedir (Hossain, 2011).

Bazı ilaç ve gıdaların hammaddesi olan salep, Türkiye'nin birçok bölgesinde doğal olarak yetişen orkidelerin yumrularından elde edilmektedir. Salep, ana maddesi aynı isimle de anılan (salep tozu) bilinen yerli bir Türk içeceği. Salep aynı zamanda geleneksel Kahramanmaraş tipi dondurmanın da bir malzemesidir. Salep, dondurma üretiminin yanısıra şekerlemelerde ve içeceklerde kullanılmaktadır (Dogan ve Kayacier, 2004; Ece Tamer, Karaman ve Utku Copur, 2006; Kasperek ve Grimm, 1999).

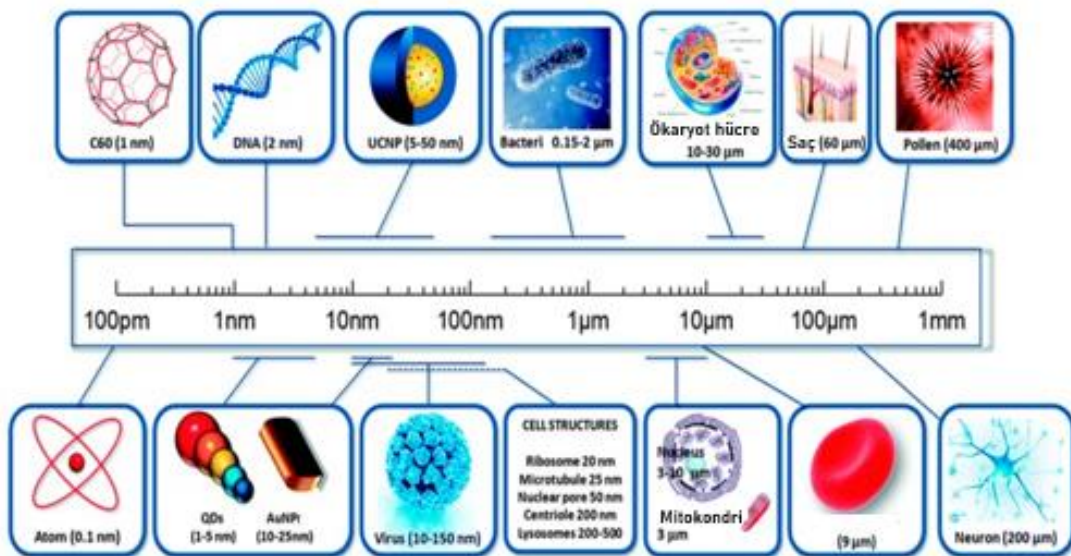
## 2.5. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji fikri ilk olarak 1965 yılında ünlü fizikçi ve nobel ödüllü Richard P. Feynman tarafından önerilmiştir (S. Khan ve diğerleri, 2022). Nanoteknoloji, boyut ve yapıya bağlı özellikler ve fenomenlerden yararlanmak, yeni veya çok farklı özelliklere sahip malzemeler ve cihazlar oluşturmak için nano ölçekli aralıktaki maddeyi manipüle etmek ve kontrol etmek amacıyla bilimsel bilginin uygulanması olarak tanımlanmaktadır (Joseph ve Morrison, 2006; Y. Luo, Wang ve Zhang, 2020).

Nanoteknolojinin kontrol edilebilir malzeme özellikleri, Norio Taniguchi'nin 1974'te "Nanoteknoloji" terimini ilk defa kullandığı makalesinde belirtilmiştir (Hulla, Sahu ve Hayes, 2015).

Yunancada 'cüce' anlamına gelen 'nano' öneki metrenin milyarda birini ( $10^{-9}$  m) göstermektedir. Bir nanometre  $10^{-9}$  metredir ve bir insan saçının çapı yaklaşık 50 mikron ( $50 \times 10^{-6}$  metre) boyutundadır (Mansoori ve Soelaiman, 2005).

Yani bir nanometre, insan saçının çapından 60.000 kat daha küçüktür. Bir DNA çift sarmalı ise 1 nm yarıçapındadır (Şekil 2.13) (Gnach, Lipinski, Bednarkiewicz, Rybka ve Capobianco, 2015).



Şekil 2.13. Farklı boyutlardaki nanomalzemelerin karşılaştırılması (Gnach ve diğerleri, 2015).

Nanoteknoloji biyoloji, fizik, mühendislik, mikroelektronik ve tarım gibi çok çeşitli alanlarda uygulamalara sahiptir. Günümüzde moleküler biyoloji, fizik, kimya, tıp ve malzeme bilimi gibi farklı alanlarda nanopartiküllerin (NP'lerin) kullanımı da beklenmedik bir şekilde artış göstermektedir (Chatterjee ve Kumar, 2022; Jamkhande, Ghule, Bamer ve Kalaskar, 2019).

### **2.5.1. Nanopartiküllerin Özellikleri ve Sınıflandırılması**

Nanoteknolojinin temel yapı bileşenleri olan NP'lerin kullanımı 21. yüzyılda en umut verici alanlardan biridir (Gudikandula ve Charya Maringanti, 2016; Tamez Ramírez ve Vega-Cantú, 2019). NP'ler benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip oldukları için son zamanlarda artan bir ilgi görmektedir (Curulli, 2020). Avrupa komisyonuna göre 'Nanopartikül', boyutu 1–100 nm arasında bir veya daha fazla dış boyutu olan, bağlanmamış, agregre (toplu) veya aglomere (yığın) halde partiküller içeren doğal, tesadüfi veya üretilmiş bir malzeme'' olarak tanımlanmaktadır (Bleeker ve diğerleri, 2013).

Nanopartiküllerin nano-boyuttaki özellikleri, aynı materyalin daha büyük parçacıklı halinden büyük ölçüde farklılık göstermektedir (Jahnel, Fleischer ve Seitz, 2013). Nano-boyuta inildiği zaman malzemeler benzersiz mekanik, elektrik, optik ve manyetik özellikler sergilemektedir (Nath Roy, Goswami ve Pal, 2017). Nanopartiküller, boyut ve şekillerine bağlı farklı özellikler sergiledikleri için biyoalgılama ve katalizörlerden optiğe, antimikrobiyal aktiviteye, bilgisayar transistörlerine, elektrometrelere, kimyasal sensörlere ve kablosuz elektronik mantık ve bellek şemalarına kadar değişen uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu parçacıkların ayrıca tıbbi görüntüleme, nanokompozitler, filtreler, ilaç dağıtımı ve tümörlerin hipertermisi gibi farklı alanlarda birçok uygulaması vardır (Iravani, 2011).

Nanopartiküllerin hücre altı ölçekte olması, üstün sitouyumluluk ve biyoaktivite sağlamaktadır. Bu özellikler sayesinde NP'ler moleküler çözünürlükte hücrelerle etkileşime girebilmektedir (H. Chen ve diğerleri, 2013). NP'lerin ultra ince parçacık boyutunun yaklaşık olarak 100 nm ile sınırlı olduğu gösterilmiştir. Bu nanoölçek aralığının biyolojik bilimlerde önemli uygulamalara sahip olduğu bilinmektedir. Çapı 12 nm'den küçük olan nesnelere kan-beyin bariyerini geçme özelliği ve 30 nm veya daha küçük nesnelere hücreler tarafından endositoz yapılabilme özelliği vardır (Nath Roy ve diğerleri, 2017).

Nanomalzemelerin (NM'lerin) kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre düzenlenmesi ve sınıflandırılması, nanomalzemelerin çeşitliliğini anlamak için esastır (Makhlouf ve Barhoum, 2018). NM'ler genel olarak boyutsallık, morfoloji, durum ve kimyasal bileşimler gibi kriterlere göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir (Gleiter, 2000). Nanomalzemeler kimyasal kompozisyonlarına dayalı olarak organik bazlı NM'ler ve inorganik bazlı NM'ler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır (Makhlouf ve Barhoum, 2018; Rizwan, Shoukat, Ayub, Razzaq ve Tahir, 2021).

Organik bazlı NM'ler, esas olarak karbonhidratlar, lipitler veya 10 nm ila 1 µm aralığındaki polimerler gibi organik bileşiklerden oluşan malzemeleri içermektedir. Organik nanomalzemeler, olağanüstü fiziko-optik özellikleri ve kolay sentezleri nedeniyle son zamanlarda malzeme, algılama, biyotıp ve diğer alanlardaki çeşitli uygulama alanlarında artan bir ilgi görmektedir (Choudhury ve Das, 2021; Hadinoto, Sundaresan ve Cheow, 2013). İnorganik nanomalzemeler demir oksit NP'ler, karbon bazlı NP'ler, metal nanomalzemeler, kuantum noktaları (KN) vb. içermektedir (Ju, Dong, Yu ve Hou, 2019; Makhlouf ve Barhoum, 2018).

### **2.5.2. Metal Nanopartiküller**

Metal nanopartiküller (MNP'ler), nanoteknolojideki büyük potansiyelleri nedeniyle son birkaç on yıldır bilim adamlarının ilgi odağı olmuştur. Farklı boyutlarda, şekillerde ve çeşitli yüzey modifikasyonları ile sentez olasılığı, MNP'lerin antikorlarla, hedef ligandlarla ve ilaçlarla konjuge olmasına izin vermektedir. Bu özellikler sayesinde geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir (S. A. Khan, 2020).

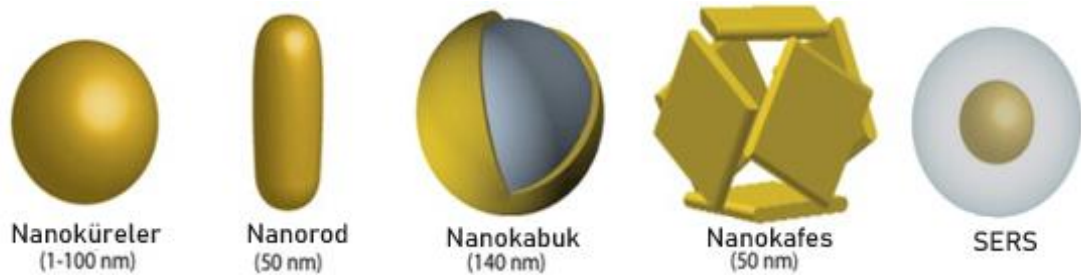
#### **2.5.2.1. Altın Nanopartiküller**

Altın genellikle  $+1$  (Au [I] ve  $+3$  (Au [III] olmak üzere iki yaygın formda bulunmaktadır (S. Jain, Hirst ve O'Sullivan, 2012). Altın nanopartiküller (AuNP'ler), optik özellikleri nedeniyle, özellikle cam boyama için eski çağlardan beri teknolojik olarak, sistematik araştırmalar ve biyolojik uygulamalar için kullanılmaktadır (Sperling, Rivera Gil, Zhang, Zanella ve Parak, 2008). Küçük altın parçacıklarının olağandışı optik özellikleri, boyutlarına bağlı elektrokimyasaları ve yüksek kimyasal kararlılıkları, onları kendi kendine birleşme, biyolojik etiketleme, kataliz, elektron transfer teorileri, faz transferi, DNA erimesi ve tahlilleri ve kristal büyümesi dahil olmak üzere çok çeşitli fenomenleri keşfetmek için tercih edilen model sistem haline getirmiştir (Sardar, Funston, Mulvaney ve Murray, 2009).

AuNP'ler, benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olduğu için farmasötiklerin taşınması ve salınmasında kullanılmaktadır. Altın çekirdek esasen inerttir ve toksik değildir. İkinci bir avantaj, sentezlenmesi kolaydır. Monodispers NP'ler, 1 nm ila 150 nm arasında değişen çekirdek boyutlarında oluşturulabilmektedir (Ghosh, Han, De, Kim ve Rotello, 2008).

AuNP'ler hem kimyasal hem de biyolojik (yeşil sentez) olarak sentezlenmektedir. Günümüzde AuNP'lerin yeşil sentezi sentetik tehlikeli indirgeyici ajanlar kullanılmadığı için daha çok kabul görmektedir. AuNP'lerin yüzeyleri moleküller veya maddelerle kolayca işlevselleştirilebilmektedir. Böylece AuNP'lerin stabilitesi ve organik ortamdaki dağılımı artmaktadır. Ayrıca, bu yüzey değiştiriciler, ilaçların hedef bölgeye ulaştırılması için hedefleme parçaları olarak kullanılabilir. AuNP'lerin yüzey modifikasyonu kolaydır ve böylece AuNP'ler ile pasif ve aktif hedefleme mekanizmaları kullanılarak kanserli dokular hedeflenmektedir (Şekil 2.14) (S. A. Khan, 2020).

Biyomedikal uygulamalar için kullanılan çeşitli metal nanopartiküller arasında en kararlı nanopartikül olan AuNP'ler, antik tıpta kronolojik uygulamaları, iyileştirilmiş biyomedikal uygulamaları, artrit ve kanser tedavisi gibi uzun tıbbi kullanım geçmişi nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Bhattacharya ve Mukherjee, 2008; E. Y. Kim, Kumar, Khang ve Lim, 2015; S. K., Srivastava, Yamada, Ogino ve Kondo, 2013). Bununla birlikte AuNP'ler, insan serviks, göğüs, prostat ve akciğer kanser hücreleri gibi çeşitli hücre hatları üzerinde *in vitro* anti-anjiyojenik, anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkiler göstermektedir (Mioc ve diğerleri, 2019). Son zamanlarda birçok çalışmada, AuNP'lerin endositoz yoluyla insan hücrelerine verimli bir şekilde alınmalarına rağmen çok az sitotoksikite gösterdiği bildirilmiştir. Biyoyumluluklarının yanı sıra sentezlenmelerinin ve karakterize edilmelerinin kolay olması, çeşitli biyomedikal uygulamalarda daha fazla dikkat çekmesine yol açmıştır; bu da AuNP'lerin etkili bir anti-kanser ilaç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Ajnai ve diğerleri, 2014a; Bhattacharya ve Mukherjee, 2008; Connor, Mwamuka, Gole, Murphy ve Wyatt, 2005).



**Şekil 2.14.** Antikanser tanı ve tedavi uygulamalarında yaygın olarak kullanılan altın nanopartikül türleri (Ajnai ve diğerleri, 2014) .

AuNP'ler yaygın olarak uygulanmasına rağmen, biyolojik sistemlerin nanopartiküllere nasıl tepki verdiğinin net bir şekilde anlaşılması önemlidir ve AuNP'lerin benzersiz boyuta bağlı fizikokimyasal özelliklerinin karakterizasyonu kritik bir bileşen olarak bilinmektedir (Arvizo ve diğerleri, 2011). Yapılan bir çalışmada, AuNP'lerin terapötik etkilerinin yüzey boyutuna bağlı olarak değiştiği ve terapötik etkide büyük bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Çok küçük çaplı (<2 nm) AuNP'ler, hücrelere ve çekirdek gibi hücresel bölmelere nüfuz edebilmektedir ve aşırı derecede toksik olabilmektedir. Örneğin, 1.4 nm çapında küresel AuNP'lerin çeşitli hücre hatlarında oksidatif stres mekanizmaları yoluyla nekroz ve mitokondriyal hasarı indüklediği bulunmuştur. Dahası AuNP'ler bu boyutta iyi bilinen katalitik aktiviteleriyle ilişkilendirilebilmiştir (Alkilany ve Murphy, 2010; Y. Pan ve diğerleri, 2009). Connor ve ark., 18 nm çapındaki AuNP'lerin hücrelere nüfuz ettiğini ve bu AuNP'lerin insan hücreleri için toksik olmadığını bildirmiştir (A. Z. Wang ve diğerleri, 2012).

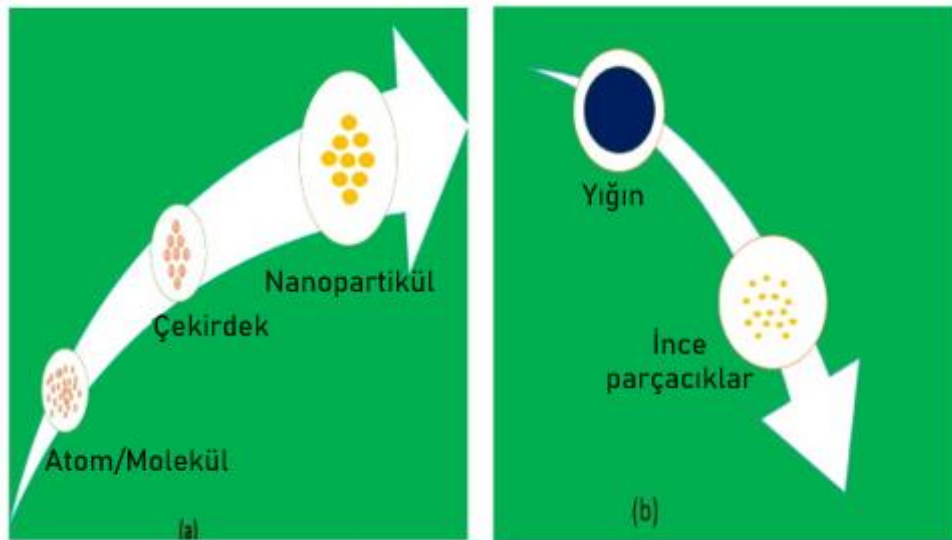
### 2.5.2.2. Altın Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

Sentez yöntemleri, nanomalzemelerin boyutunu, bileşimini, şeklini ve yüzey alanını kontrol etmede çok önemli bir rol oynamaktadır. Nanomalzemelerin özelliklerinden yararlanmak amacıyla belirli uygulamalara uyarlamak için çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Knauth ve Schoonman, 2005; Yin ve Talapin, 2013).

NP'ler, belirli boyutları, şekilleri, bileşimleri, daha büyük yüzey alanı/hacim oranları ve bileşenlerin saflığı nedeniyle dikkat çekici özelliklere sahiptir (Jacob, Sharma ve Balakrishnan, 2017; I. Khan, Saeed ve Khan, 2019). NP'ler bu benzersiz özellikleri, sentez aşamasında farklı parametre ve yöntemlerin kullanılmasıyla kazanmaktadır. Bu özellikler NP'lerin antimikrobiyal, antikanser ve anti-inflamatuar etkinlik göstermelerini sağlamakla birlikte ilaç taşıyıcı ve farmasötik ürünlerin hazırlanmasına olanak sağlamaktadır (Kumari, Tyagi ve Jagadevan, 2019).

Nanopartikül sentezi fiziksel, kimyasal ve yeşil sentez olmak üzere üç farklı yöntemle yapılabilmektedir (Roy, Ghosh ve Sarkar, 2017). Mekanik enerji kullanılarak fiziksel özelliklerin ön plana çıktığı yöntemler fiziksel ve kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği yöntemler ise kimyasal temelli olarak kabul edilmektedir (Gürmen, Ebin ve İtü, 2008). Yeşil sentez ise bitkiler gibi biyolojik organizmalar veya bunların ürünleri kullanılarak nanopartiküllerin sentezlenmesine yönelik bir yaklaşımdır (Nadaroglu, Gungor ve Selvi, 2017).

Nanopartiküller fiziksel yöntemde yukarıdan-aşağı ve aşağıdan-yukarı olmak üzere iki ana yolla üretilmektedir (Kolahalam ve diğerleri, 2019; Mansfield, Kaiser, Fujita ve Van de Voorde, 2017). Yukarıdan aşağıya yaklaşımlarda, nano yapıları malzemeler üretmek amacıyla yığın halinde bulunan malzemeler parçalanmaktadır (Baig, Kammakam ve Falath, 2021). Yukarıdan aşağıya yöntemlerin avantajları, iyi kurulmuş ekipman mevcudiyeti ve kolay prosedürlere sahip olmasıdır (Şekil 2.15) (Sajid, 2022). Bu yöntemin en büyük dezavantajı, istenen partikül boyutu ve şeklini elde etmenin zorluğudur (Kolahalam ve diğerleri, 2019). Aşağıdan-yukarıya yaklaşımlarda nanopartiküller sıvı veya gaz fazında yoğunlaştırılır; burada daha küçük iyonların kimyasal kombinasyonu ile daha büyük materyaller oluşturulmaktadır (Kolahalam ve diğerleri, 2019). Bu tür yaklaşımların ana avantajları, NP boyutlarının daha iyi kontrolü, daha az yapısal kusur, homojen kimyasal bileşim, düşük maliyet ve kolay ölçeklenebilirliktir. Dezavantajlar esas olarak uyumlu yüzeyler ve moleküllerin gerekliliği ile ilgilidir. Atomik ve moleküler seviyelerde manipüle etmek zordur (Sajid, 2022).



**Şekil 2.15.** Nanopartiküllerin sentezi için kullanılan yöntemler (a) aşağıdan yukarıya yaklaşım ve (b) yukarıdan aşağıya yaklaşım (Ahmed, Ahmad, Swami ve Ikram, 2016).

Kimyasal sentez yönteminde genel olarak, farklı iyonların çözeltileri, iyi tanımlanmış miktarlarda ve kontrollü ısı, sıcaklık ve basınç koşulları altında, çözeltide çöken çözünmeyen bileşiklerin oluşumunu teşvik etmek için karıştırılmaktadır (Mansfield ve diğerleri, 2017). Kimyasal sentez yolunun çeşitli faydaları olmasına rağmen, yüksek miktarda çözücü, yüzey aktif maddeler ve diğer kimyasalların kullanılması sentezlenmiş NP'lerin biyolojik sistemlerde uygulama alanlarını sınırlamaktadır (Narayanan ve Sakthivel, 2010). NP'lerin sentezinde kullanılan fiziksel ve kimyasal sentezlerin önemli ölçüde pahalı olmasının yanı sıra toksik yan ürünlerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Yeşil sentez ise daha ucuz ve sentezlenmesi basit olmakla birlikte çevreye olan kimyasal yükü azaltmaktadır. Ayrıca sentez esnasında gereksiz muameleleri bertaraf etmektedir (Kumari ve diğerleri, 2019).

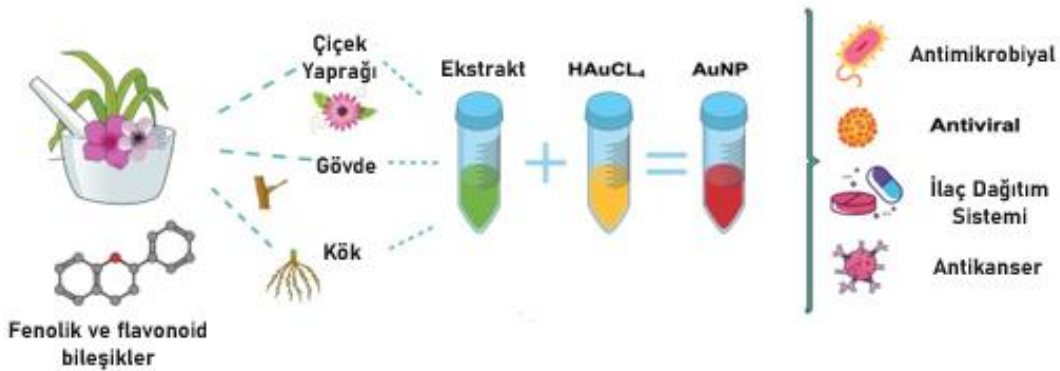
### 2.5.2.3. Altın Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi

AuNP'ler gibi soy metallerin nanopartiküllerinin üretimi, benzersiz özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Boyut ve şekillerinin manipülasyonu, ilaç dağıtımı, doku/tümör görüntüleme ve kanser tedavisi gibi biyomedikal uygulamalarda potansiyel uygulamalara sahip benzersiz özellikler üretmektedir (P. K. Jain, Lee, El-Sayed ve El-Sayed, 2006; Mahal ve diğerleri, 2013; Paciotti ve diğerleri, 2004; Peng ve diğerleri, 2009; Schmid ve Corain, 2003; Singh, Khullar, Dave, Kaur ve Bakshi, 2013).

AuNP yeşil sentezinin mekanizması iki aşamalı basit bir süreçten oluşmaktadır. İlk adımda, biyolojik ekstrakt (örneğin bitki, bakteri veya mantar ekstraktı) HAuCl<sub>4</sub> tuz çözeltisi ile karıştırılır, bu da altın (Au<sup>+3</sup>) iyonlarının altın atomlarına (Au<sup>0</sup>) indirgenmesine neden olmaktadır. İkinci adımda büyüme ve stabilizasyon AuNP oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Son olarak, ortaya çıkan çözeltilerin renk değişimi AuNP'lerin oluşumunu göstermektedir (Javed ve diğerleri, 2020; Mikhailova, 2021).

AuNP'lerin bitki kaynaklarından yeşil sentezi kolaydır ve tek adımlı bir işlemi içermektedir. AuNP'leri bitki kaynaklarından sentezlemek için bitkinin farklı kısımları (yapraklar, meyveler, ağaç kabuğu, çiçek, kabuklar, tohum, rizom kökü vb.) damıtılmış su ile yıkanır, kurutulur, toz haline getirilir ve ekstrakt elde etmek için damıtılmış suda belirli bir sıcaklığa kadar kaynatılır. Daha sonra ekstraktı saflaştırmak için filtreleme veya santrifüjleme teknikleri kullanılır ve bu daha sonra çeşitli konsantrasyonlarda altın tuzu çözeltisiyle basitçe karıştırılır. Altın tuzu çözeltisi AuNP'lere indirgenir ve reaksiyon dakikalar ila birkaç saat arasında tamamlanır. Reaksiyon karışımı, altın tuzunun tamamen

azaltılması için ayrıca inkübe edilir ve renk değişimi ile görsel olarak izlenir. Son olarak, sentezlenen AuNP'ler santrifüjleme yoluyla saflaştırılır ve daha sonra kullanılmak üzere yıkama yapılır. Tüm süreç basit, çevre dostudur ve kolaylıkla ölçeklendirilebilmektedir (Şekil 2.16) (Ahmed, Annu, Ikram ve Yudha S., 2016). Harici stabilizasyon/kapama ajanlarının eklenmesine gerek yoktur çünkü fitokimyasalların kendisi stabilizasyon ajanlarının yanı sıra indirgeyici ajanlar olarak da hareket etmektedir. Kullanılan bitkilerdeki ve mikroorganizmalardaki proteinler, enzimler, fenolik bileşikler, aminler, alkaloidler ve pigmentler gibi moleküllerin indirgenmesiyle nanopartikül sentezi meydana gelmektedir. Bu sentez yöntemi çevre dostu, uygun maliyetli, biyoyumlu, güvenli ve biyolojik bir yaklaşım olarak bilinmektedir (Abdul Salam, Sivaraj ve Venckatesh, 2014; Ahmed, Annu, ve diğerleri, 2016; Nadaroglu ve diğerleri, 2017).



**Şekil 2.16.** AuNP'lerin yeşil sentezi ve uygulama alanları (Soto, Mendoza, López-Romero, Gasca-Tirado ve Manzano-Ramírez, 2021).

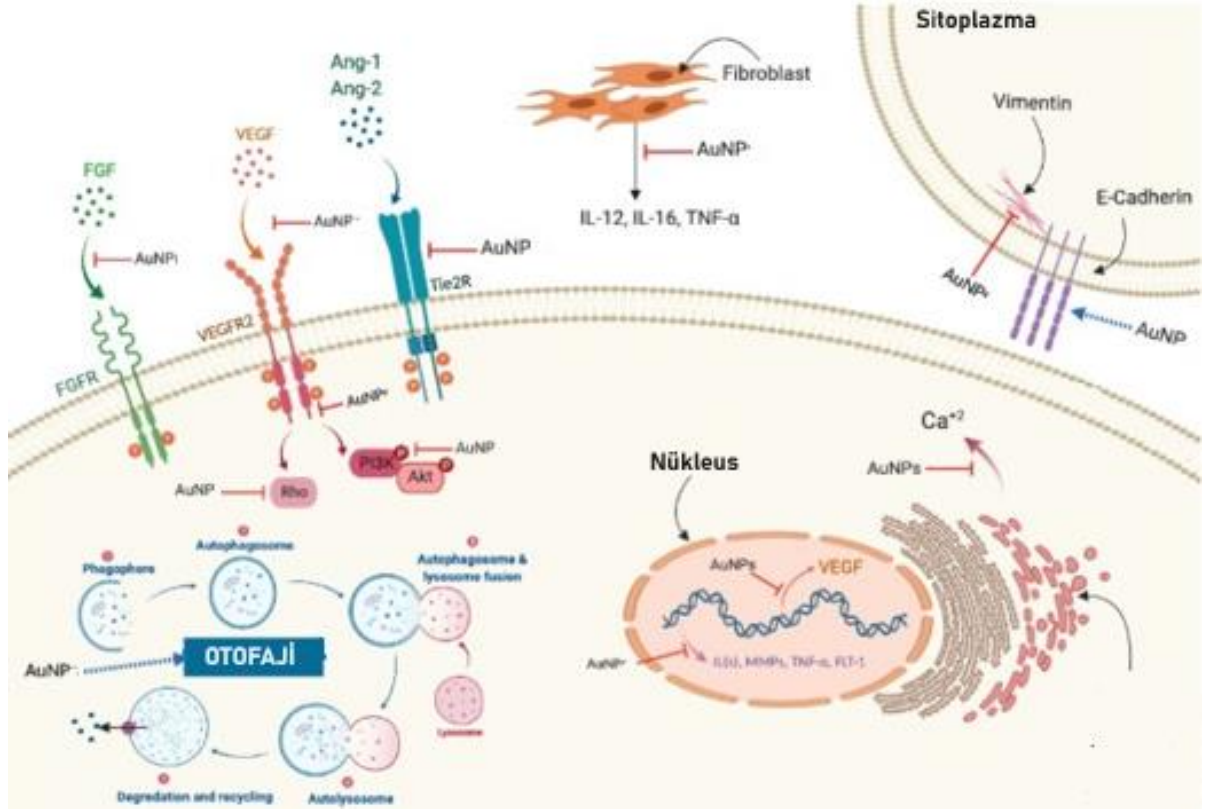
Günümüzde “yeşil” kimya ve kimyasal süreçler konusuna ilgi artmaktadır. Yeşil sentez ile üretilen atıkların tamamen ortadan kaldırılması veya en azından en aza indirilmesi ve sürdürülebilir süreçlerin uygulanması amaçlanmaktadır (Raveendran, Fu ve Wallen, 2003). Geleneksel fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak büyük miktarlarda nanopartikül sentezlemek için daha az zaman harcansa da kararlılığı korumak için kaplama ajanları olarak toksik kimyasallara ihtiyaç duyulmaktadır. Metal iyonlarının indirgenmesinde rol oynayan indirgeyici ajanlar ve üretilen nanopartiküllerin istenmeyen aglomerasyonunu önlemek amacıyla kullanılan stabilize edici ajanlar, çevre ve hücre için toksisite riski taşımaktadır. Ayrıca üretilen nanopartiküllerin içeriklerinin şekil, boyut ve yüzey kimyası açısından toksik olduğu düşünülmektedir. Biyoyumluluk gösteren nanopartiküllerin üretildiği yeşil sentez yönteminde, bu ajanlar kullanılan biyolojik organizmalarda doğal olarak bulunmaktadır (Abdul Salam ve diğerleri, 2014; Hussain, Singh, Singh, Singh ve Singh, 2016).

Toksik, pahalı kimyasallar ve yüksek enerji tüketimi kullanılmadan doğal indirgeyici, kaplama ajanları ve stabilize edici ajanların kullanıldığı verimli yeşil sentezin ilerlemesiyle, araştırmacılar biyolojik yöntemleri kullanmaya başlamıştır (Hussain ve diğerleri, 2016). NP sentezinde biyo-indirgeyici ajanlar olarak doğal kaynakların kullanımı, insan sağlığına ve çevreye potansiyel olarak zararlı binlerce kimyasalı ortadan kaldıran, aynı zamanda uygun tek adımlı alternatif yöntemdir. NP'lerin yeşil sentezi, bu yöntemin basit, ucuz ve tekrarlanabilir olması nedeniyle diğer yöntemlere göre daha uygundur. Bu avantajların yanı sıra bu yöntem çevre dostudur ve çevre üzerinde çok az veya hatta hiç tehlikeli etkisi yoktur ve aynı zamanda NP'lerin özelliklerini yönetmek için iki önemli faktör olan düzgün parçacık boyutu ve morfolojisini vermektedir. Ayrıca yeşil sentez yapılırken konsantrasyon ve ortamın sıcaklığı kontrol edilerek istenilen şekil ve boyutta nanopartikül elde edilebilmektedir (Husen ve Siddiqi, 2014). Kısacası, biyomateryal kullanılarak NP'lerin yeşil sentezi, tehlikeli kimyasalların kullanımını içeren zorlu yöntemlerden geçerek, paha biçilemez NP'lerin üretimi için mükemmel bir alternatif yol sağlamaktadır (Hasan ve diğerleri, 2018). Birçok avantajından dolayı, NP üretimi için daha iyi, uzun ömürlü, güvenli ve temiz yöntemler elde etmek için hem endüstriyel hem de ticari düzeyde yararlanılabilecek maliyeti düşürmeye, verimi artırmaya ve daha iyi yöntemler geliştirmeye yardımcı olan bu tür stratejilerin geliştirilmesi önemlidir. Bu nedenle daha yeşil, çevre dostu, etkin, ucuz reaktif kullanarak maksimum üretim yapan, insan sağlığına ve çevreye olumsuz etkisi olmayan yöntemlerin araştırılması gerekmektedir (Hasan ve diğerleri, 2018).

#### **2.5.2.4. Altın Nanopartikülün Antikanser Etkileri**

AuNP'ler kanserin tıbbi tedavisi için terapötik moleküller olarak kullanılabilir. Farklı çalışmalarda altın nanopartiküllerinin belirli kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik özellikler gösterdiği, bunun mekanizmasının tam olarak açıklanamadığı ve bunların antikanser terapötikleri olarak kullanılmasının daha fazla araştırma gerektirdiği görülmektedir. Öte yandan, AuNP'ler hücre zarı ile etkileşime girebilmekte ve hücre içinde içselleşebilmektedir. Bu sayede ROS üretimi, DNA hasarı, apoptozun aktivasyonu, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, hücre parçalanması, hücre büyümesinin inhibisyonu ve membran stabilitesinin kaybı yoluyla sitotoksik aktivite göstermektedir (Donga, Bhadu ve Chanda, 2020; Soto ve diğerleri, 2021).

AuNP'lerin antikanser özelliklerinin bir diğer önemli mekanizması hücrelerde anjiyogenezin inhibisyonudur. AuNP'lerin in vitro insan retinal mikrovasküler endotel hücrelerinin (HRMEC'ler) VEGF-A'nın neden olduğu migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Song ve diğerleri, 2017). AuNP'lerin uygulanmasının, birçok modelde in vivo anti-anjiyojenik aktiviteyle sonuçlandığı da bildirilmiştir. AuNP'lerin tümör endotel hücrelerinde, damar aşırı geçirgenliği ile ilişkili olan VEGFR2 ekspresyonunu inhibe ettiğini ve damar aşırı geçirgenliğini azalttığı gözlemlenmiştir. AuNP tedavisi, SW620 insan kolorektal kanseri ile aşılınmış çıplak farelerde tümör damar sistemini normalleştirmiştir (Şekil 2.17) (F. Pan ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.17. AuNP'lerin anti-kanser etkilerinden etkilenen moleküler yollar (Darweesh, Ayoub ve Nazzal, 2019).

Hayvan çalışmaları ile AuNP'lerin inflamatuvar sitokinleri ve MMP salınımını baskıladığı gösterilmiştir. AuNP'ler, H-357-PEMT hücrelerinde MMP-2'yi p53 ve p21'e bağımlı bir şekilde inhibe etmektedir (Satapathy ve diğerleri, 2018). AuNP'ler, epitelyal işaretleyici E-kadherinin upregülasyonu ve mezenkimal protein vimentinin downregülasyonu ile EMT'yi azaltmıştır (W. Li ve diğerleri, 2017).

Sentez için kullanılan şekil, boyut ve bitki ekstraktı antikanser aktivitesinde, özellikle hücre zarı ile etkileşimde ve içselleştirmede önemli bir role sahiptir, bu anlamda, çoğu çalışmada elde edilen benzer şekilde küçük boyutlu küresel nanopartiküller tercih edilmektedir (Surapaneni, Bashir ve Tikoo, 2018; Tian ve diğerleri, 2016). Enea ve arkadaşları, insan HepaRG hücrelerinde ve primer sıçan hepatositlerinde (PRH) farklı şekil ve boyutlardaki altın nanopartiküllerinin güvenliğini değerlendirmiştir. Test edilen tüm nanopartiküller arasında, daha küçük olan 15 nm küreler, nanopartiküller sitratla kapatıldığında en yüksek toksisiteyi gösterirken; 60 nm çaplı nanostarlar daha düşük toksisite göstermiştir (Enea ve diğerleri, 2021).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Altın Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu

##### 3.1.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması

*Orchis Spitzelii* (Salep) kök kısımları nanopartikül sentezinde kullanılacak bitki örneği olarak Kahramanmaraş ilinde bulunan yerel dondurma satıcılarından temin edildi. Bitki örneklerinin kök kısımları distile su ile toprak kalmayacak şekilde yıkandı ve karanlık ortamda 4 günde kurutuldu. Kuruyan bitki örnekleri havan ile dövülerek öğütüldü. Hassas terazide öğütülen bitkiden 1 g tartılarak 40 mL distile su içerisinde homojen hale getirildi. Bu işlemi takiben bitkinin sulu ekstraktını elde etmek için karışım 60°C sıcaklıktaki su banyosuna konuldu ve 10 dakika aralıklarla yavaşça karıştırılarak 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda su banyosundan çıkartılan ekstrakt, filtre kâğıdı (Whatman Filtre Kâğıdı No.1) ile süzülerek posasından ayrıldı. Berrak süpernatant amber şişelerde hava ile teması kesilerek kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edildi.

##### 3.1.2. Altın Nanopartikül Sentezi

Altın nanopartikül (AuNP) oluşum ve varlığının incelenmesi “pH, sıcaklık, Tetrakloroaurik Asit ( $\text{H}_2\text{AuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) konsantrasyonu, ekstrakt konsantrasyonu, zaman” gibi farklı parametrelerin değiştirilmesi ile gerçekleştirildi. AuNP’lerin sentezi için, hazırlanan Tetrakloroaurik Asit (Merck, #520918) sulu çözeltisi ile Salep bitki ekstraktı otoklav şişesi içerisinde 90°C’ye ayarlanmış manyetik karıştırıcıda reaksiyona bırakıldı ve belirli aralıklarla UV-Vis spektrofotometre ölçümleri alındı. Altın iyonlarının indirgenmesi ile sarı renkli çözeltilerin yakut kırmızısına doğru renk değiştirdiği gözlemlendi. Manyetik karıştırıcıdan 5 saat 30 dakika sonunda alınan otoklav şişeleri 15 dk buz üzerinde bekletildi. Sonrasında oluşan AuNP’ler 9.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı faz uzaklaştırıldı (+4°C) ve üzerine %96’lık etil alkol (Honeywell, #32221) ilave edilip 9.000 rpm’de 15 dakika tekrar santrifüj edilip yıkama işlemi uygulandı (+4°C). Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Elde edilen katı kısım amber cam şişe içerisine toplandı ve etüvde kurutuldu. AuNP karakterizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere +4°C ortamında muhafaza edildi.

### 3.1.3. Altın Nanopartikül Karakterizasyonu

AuNP'lerin karakterizasyonu çeşitli analitik cihazlar ile gerçekleştirildi. AuNP'lerin UV-Vis spektrumları, 200 ila 800 nm arasında bir UV-Vis spektrofotometresi (Multiskan™ FC Microplate Photometer) ile kaydedildi. AuNP'lerin kristal yapısının belirlenmesinde, 20-80 derece aralığında ve 0.02 adım boyutunda X-ışını kırınım (XRD) sistemi (PANalytical Empyrean XRD) kullanıldı. Parçacıkların polidispersite indeksi ile hidrodinamik boyutu ve yükünü belirlemek için DLS (Dinamik Işık Saçılımı) ve zeta analizörü kullanıldı. DLS ve zeta potansiyel değerleri parçacık/zeta analizörü (Zetasizer nano ZS, Malvern Ltd., İngiltere) ile kaydedildi.

AuNP'lerin morfolojik ve boyut analizleri için taramalı elektron mikroskopuyla ilişkili EDX (enerji dağılımlı X-ışını analizi) analizörü (FE-SEM/EDX, ZEISS GeminiSEM 500) kullanılarak kompozisyon çalışması yapıldı. AuNP'lerin morfoloji açısından incelenmesi geçirimsiz elektron mikroskobu (TEM, Hitachi HighTech HT7700) analizi ile gerçekleştirildi. TEM analizi için numune kurutulmadan alındı ve +4 °C sıcaklıkta saklandı. Nanopartiküllerde bulunan fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi (Thermo Scientific, Nicolet iS5) gerçekleştirildi.

## 3.2. Hücre Kültürü ve Altın Nanopartikül Uygulaması

### 3.2.1. Hücre Kültürü

NCI-H441 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı ve HUVEC insan göbek damarı endotel hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)' den temin edildi.

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattının özellikleri

#### NCI-H441 Hücre Hattı (ATCC ® HTB-174)

<b>Organizma</b>	Homo Sapiens
<b>Doku</b>	Akciğer
<b>Hastalık</b>	Papiller Adenokarsinom
<b>Morfoloji</b>	Epitelyal
<b>Cinsiyet</b>	Erkek
<b>Büyüme Özelliği</b>	Adherent

NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattını çoğaltmak için %10 Fetal Bovine (FBS, Gibco # 10270106), 100 IU/ mL Penisilin/100 mg/ml Streptomisin (Gibco # 15140-122) içeren L-Glutaminli RPMI-1640 (Gibco, # 52400-025) ve HUVEC insan göbek damarı endotel hücre hattını çoğaltmak için %10 FBS (Gibco # 10270106), 100 IU/ mL Penisilin/100 mg/ml Streptomisin (Gibco #15140-122) içeren L-Glutaminli DMEM (Sigma Aldrich, #D6429) besiyeri kullanıldı. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren 37°C'deki inkübatörde (Nüve, #EC-160) kültüre edildi.

Hücreleri çözdürmek için santrifüj tüpüne 6 ml besiyeri konuldu. -80°C'den çıkarılan hücreler hızlıca çözdürüldü ve santrifüj tüpüne alındı. Santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pelet 3 ml besiyeri içerisinde çözdürüldü. T25 flaska ekildi. T25 flask %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüve kaldırıldı.

Hücreler yeterli konfluentlik oranına ulaşınca yeni flaslara pasajlama işlemi yapıldı. Hücreler flaskın %70-80'ini kapladıktan sonra Tripsin-EDTA (Gibco, #25200-056) eklenerek etüve kaldırıldı. 5 dakika sonunda hücreler santrifüj tüpüne alındı. Santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı. Pelet 1 ml besiyerinde homojen hale getirildikten sonra T75 flaska ekildi. T75 flask %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüve kaldırıldı.

Ekim yapıldıktan sonra kalan hücreler daha sonraki çalışmalar için 1 ml dondurma medyumu (%7 Dimetil Sulfoksit (DMSO; Sigma Aldrich, #D8418), %93 FBS) içerisinde resüspanse edildi ve kriyo tüplere alınarak -80 °C'ye kaldırıldı.

### 3.2.2. Hücre Sayımı

Hücre peleti 1 ml besiyeri içerisinde çözdürüldü ve Thoma lamında (Thermo, #C964720) hücre sayımı yapıldı. Homojen hale getirilen hücre süspansiyonu ve Trypan Blue (Gibco, #15250-061) boya solüsyonundan 1:1 oranında alınarak 0,2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve pipetaj yapılarak homojen dağılması sağlandı. Boyanmış hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Thoma lamına yüklendi. Ölü hücreler mavi boyayı içine aldığı için göz ardı edilirken, mavi ile boyanmayan canlı hücreler inverted mikroskop altında 10X büyütme ile sayıldı. Canlı, ölü ve toplam hücre sayısı aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$1 \text{ ml' deki hücre sayısı} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

### 3.2.3. Hücre Canlılık Testi

AuNP, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve ekstraktın NCI-H441 ve HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi olup olmadığını değerlendirmek amacıyla Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) testi yapıldı. Bunun için 96 well plate'e her kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  etüvde 24 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda eski besiyerleri uzaklaştırıldı. AuNP için 2 kontrol grubu olmak üzere 15  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 750  $\mu\text{g/ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 1250  $\mu\text{g/ml}$ , 1500  $\mu\text{g/ml}$  ve 1750  $\mu\text{g/ml}$  dozları 6 tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  uygulandı. Celecoxib için 2 kontrol grubu olmak üzere 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 55  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ve 150  $\mu\text{M}$  dozları 6 tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  uygulandı. Tetrakloroaurik Asit için 2 kontrol grubu olmak üzere 3,25  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 18  $\mu\text{M}$ , 21  $\mu\text{M}$ , 24  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 33  $\mu\text{M}$ , 37,5  $\mu\text{M}$ , 42  $\mu\text{M}$  ve 45  $\mu\text{M}$  dozları 6 tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  uygulandı. Ekstrakt için 2 kontrol grubu olmak üzere 3,25  $\mu\text{g/ml}$ , 7,5  $\mu\text{g/ml}$ , 15  $\mu\text{g/ml}$ , 18  $\mu\text{g/ml}$ , 21  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 37,5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 75  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  ve 150  $\mu\text{g/ml}$  dozları 6 tekrarlı olacak şekilde her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  uygulandı.

AuNP, Tetrakloroaurik Asit, Celecoxib ve Ekstrakt verilmesinden 24 saat sonra uygulanan dozlar kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve Phosphate-Buffered Saline (PBS; Sigma Aldrich, #P4417) ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  MTT (Sigma Aldrich, #M2128) ve besiyeri süspansiyonu eklendi.  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  etüvde 4 saat inkübe edildi. Süre sonunda MTT solüsyonu uzaklaştırıldı ve 100  $\mu\text{l}$  DMSO eklenerek 30 dakika karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 96 well plate için spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific™ Multiskan™ SkyHigh Microplate Spectrophotometer, ABD) 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

### 3.3. RNA İzolasyonu, Konsantrasyon ve Saflık Ölçümü

qRT-PCR için NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında Trizol yöntemi ile RNA izolasyonu yapıldı. RT-PCR için 2 kontrol ve 2 doz uygulama grubu olmak üzere T25 flasklara  $8,5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ortamlı etüvde 24 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda eski besiyerleri uzaklaştırıldı. Kontrol gruplarına besiyeri eklendi. Doz uygulama gruplarına ise MTT testi ile belirlenen  $\text{IC}_{50}$  değeri olan 900  $\mu\text{g/ml}$  48 nm AuNP, 750  $\mu\text{g/ml}$  31 nm AuNP, 650  $\mu\text{g/ml}$  12 nm AuNP, 70  $\mu\text{g/ml}$  Ekstrakt ve 60  $\mu\text{M}$  Celecoxib dozu uygulandı ve  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ortamlı etüvde 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda hücreler kendi besiyerinde hücre kazıyıcı ile kaldırılarak santrifüj tüpüne aktarıldı. 800 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. İki kere 2 ml PBS ile yıkama yapıldı. Her bir örneğe 500 µl Trizol Reagent (Sigma Aldrich, # T9424) eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında (15-30°C) 5 dk inkübe edildi. 200 µl Kloroform (Honeywell, # 32211) eklenerek alt-üst edildi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. 12.000 G'de 30 dk santrifüj edildi (+4°C).

Santrifüj sonrasında faz ayırımına bakıldı, en üstteki şeffaf kısım yeni bir ependorf tüpe aktarıldı ve pelet atıldı. Süpernatant üzerine 200 µl izopropanol alkol (Honeywell, # 24137) eklendi ve tüp yavaşça alt-üst edildi. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. 12.000 G'de 30 dk santrifüj edildi (+4°C) ve süpernatant atıldı. Peletlerin üzerine 1000 µl %75'lik Etil alkol (Honeywell, # 32221) eklendi. 750 G'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelet 30 µl Nükleaz Free Water (NFW; Invitrogen, # 10977035) ile resüspanse edildi ve soğuk odaya (-80°C) kaldırıldı.

İzole edilen RNA'ların Thermo Scientific Multiskan Sky cihazı (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) Scanlt Software 6.1.1 programı kullanılarak konsantrasyon (ng/µl) ve saflık (OD260/OD280) ölçümü yapıldı. İlk olarak RNA ölçümü için hazır protokol girildi. Nanodrop plate'ine (Thermo Scientific™ µDrop™ Plate, #N12391, ABD) blank için 2µl NFW ve 2 µl RNA örneklerinden yüklendi. RNA'ların konsantrasyon ve saflığı ölçüldü.

### **3.3.1. Agaroz Jel Elektrofrez**

Agaroz jel elektrofrez yapmak için öncelikle 100 ml 1X TAE Buffer (BioShop, #TAE222.1) hazırlandı. 1 gr agaroz (Sigma Aldrich, #A9539) tartılıp otoklav şişesine alındı ve üzerine 100 ml 1X TAE Buffer eklendi. Agaroz tamamen çözünene kadar mikrodalga fırında 2-3 dk bırakıldı. Agaroz jele 5 µl Red Safe (Intron Biotechnology, #21141) eklendi ve homojen bir şekilde dağılması için 8-10 saniye karıştırıldı. Tarak yerleştirilen jel kasedine karışım döküldü ve jelin donması için 30 dakika bekletildi.

Jel donduktan sonra taraklar çıkartıldı ve jel kasetlerle birlikte elektrofrez tankına yerleştirildi. İlk kuyucuğa 6 µl RNA Ladder (Thermo Scientific™, #SM1823) yüklendi. Sonraki kuyucuklara 4 µl Loading Dye (Thermo Scientific™, #R0641) ile karıştırılmış olan 6 µl RNA örnekleri yüklendi. Elektrofrez tankı güç kaynağına bağlanarak 110 V'da 80 dakika yürümeye bırakıldı. Yürütme süresi sonunda jel tanktan alındı ve görüntüleme cihazında (ChemiDoc™ Touch Imaging System, Bio-Rad) görüntülendi.

### 3.3.2.cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'ları cDNA'ya çevirmek için RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti (Thermo,ABD, #K1622) kullanıldı. Kit protokolüne göre RNA konsantrasyonları, NFW ile 1µg'a eşitledi ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kit içerisinde çıkan bileşenlerin tümü buz üzerine alındı. Tablo 3.2'deki bileşenlerden belirtilen miktarlarda alınarak karışım hazırlandı.

**Tablo 3.2.** cDNA Sentezinde Kullanılan RNA, Primer ve Su Bileşenlerinin Miktarları

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
<b>RNA</b>	1 µg
<b>Oligo dt Primer</b>	1 µl
<b>Random Hekzamer Primer</b>	1 µl
<b>Nükleaz Free Water</b>	Toplam volüm 12 µl'ye tamamlanacak miktarda eklenir.
<b>Toplam volüm</b>	12 µl

Birer µl Oligo dT primer ve random hekzamer primerden alınarak tüpe konuldu ve mini spin yapıldı. Tüm RNA numuneleri için ayrı ayrı olacak şekilde her tüpe 2µl primer mix eklendi. Tüpler Thermal Cycler'da (ProFlex PCR, Thermo, ABD, #4484076) 65°C'de 5 dk 1 döngü olacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler tekrar buz üzerine alındı ve numune sayısına göre ayrı bir ependorf tüpün içinde Tablo 3.3'teki bileşenlerden belirtilen oranlarda mix hazırlandı.

**Tablo 3.3.** cDNA Sentezinde Enzim Karışımı İçin Kullanılan Bileşenlerin Miktarları

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
<b>5X Reaction Buffer</b>	4 µl
<b>RiboLock RNase Inhibitor</b>	1 µl
<b>10mM dNTP Mix</b>	2 µl
<b>RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)</b>	1 µl
<b>Toplam volüm</b>	8 µl

Tablo 3.3'te verilen bileşenlerden hazırlanan karışım pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karıştırıldı. Tablo 3.3'te hazırlanan mix tablo 3.2'de hazırlanan 12 µl'lik RNA-primer karışımı üzerine 8'er µl eklendi. Tüpler Thermal Cycler (ProFlex PCR, Thermo, ABD, #4484076) cihazına konuldu ve sırasıyla 42°C 60dk, 25°C 5dk, 42°C 60dk ve 70°C 5 dakika inkübe edildi. İşlem sonunda tüpler cihazdan alındı ve -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.3.3. Primer Dizayını

β-Actin, CD36, PPAR-γ, TIMP2, MMP2, PGE2, COX-2 ve VEGFR2 genlerine spesifik primerler Primer-Blast programı ile tasarlanarak Genoks firmasından sipariş verildi. Tüm primerlerin stokları 100 µM olarak geldi. Kullanılan primer sekansları ve PCR ürünlerinin uzunlukları Tablo 3.4'te verilmiştir.

**Tablo 3.4.** Ekspresyon analizinde kullanılan genlere spesifik primer dizileri.

Hedef Gen	Primerler
<b>β-Actin</b>	F: 5'CACCATTGGCAATGAGCGGTTC'3 R: 5'AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT'3
<b>CD36</b>	F: 5'CAGGTCAACCTATTGGTCAAGCC'3 R: 5' GCCTTCTCATCACCAATGGTCC'3
<b>PPAR-γ</b>	F: 5' AGCCTGCGAAAGCCTTTTGGTG'3 R: 5' GGCTTCACATTCAGCAAACCTGG'3
<b>TIMP2</b>	F: 5'ACCCTCTGTGACTTCATCGTGC'3 R: 5' GGAGATGTAGCACGGGATCATG'3
<b>MMP2</b>	F: 5'AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA'3 R: 5'CATTCCAGGCATCTGCGATGAG'3
<b>PGE2</b>	F: 5'CGGTGAAACTCTGGCTAGACAG'3 R: 5'GCAAACCGTAGATGCTCAGGGA'3
<b>COX-2</b>	F: 5'TTCCTCCTGTGCCTGATGATT'3 R: 5'AAAACCTGATGCGTGAAGTGCT'3
<b>VEGFR2</b>	F: 5' GGAACCTCACTATCCGCAGAGT'3 R: 5' CCAAGTTCGTCTTTTCCTGGGC'3

### 3.3.4. qRT-PCR

NCI-H441 insan akciğer kanseri hücre hattında AuNP, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt uygulamasından sonra hedef genlerin ekspresyon seviye farklılıklarının tespit edilmesi amacıyla Quant Studio 3 (Thermo, ABD) cihazı ile Kantitatif Real Time PCR yapıldı. qRT-PCR çalışması için DNA Green Master Kit (Roche, Version 07, #06402712001) kullanıldı. Tüm genler için 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

Çalışılacak hedef genler için Tablo 3.5'te bulunan miktarlarda numune sayısına göre hesaplama yapılarak mix hazırlandı. Hedef genler için hazırlanan mixten 3 tekrarlı olacak şekilde tüm kuyucuklara 8 µl konuldu ve üzerine 2 µl cDNA eklenerek dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldı.

**Tablo 3.5.** qRT-PCR'da kullanılacak reaktifler ve miktarları

<b>Reaktifler</b>	<b>Miktar</b>
<b>Syber Green</b>	5 µl
<b>Forward Primer</b>	0,5 µl
<b>Revers Primer</b>	0,5 µl
<b>dH2O</b>	2 µl
<b>cDNA</b>	2 µl

Tablo 3.6'da verilen süre ve sıcaklıklar ayarlanarak qRT-PCR yapılmıştır.

**Tablo 3.6.** qRT-PCR Basamaklarının Sıcaklık ve Süreleri

<b>Denatürasyon</b>	50 °C'de 2 dk 95°C'de 10 dk
<b>Amplifikasyon (40X)</b>	95°C'de 15 sn Primer bağlanma sıcaklığında 30 sn 72 °C'de 1 dk
<b>Uzama</b>	95 °C'de 15 sn 60 °C'de 1 dk 95 °C'de 01 sn

### 3.4. Western Blot ile Protein Kantitasyon Analizi

Western blotlama (protein blotlama veya immünoiblotlama), hücre homojenatlarındaki spesifik proteinlerin immün tespiti ve miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılan güçlü ve önemli bir tekniktir (Dubitsky, DeCollibus ve Ortolano, 2002; Kurien ve Scofield, 2006; Taylor ve Posch, 2014). Western blotlama, homojenatta bulunan proteinlerin jel elektroforezi kullanılarak boyutuna göre ayrılmasını sağlamaktadır. Jel elektroforezinde ayrılan proteinler katı bir desteğe etkili bir şekilde aktarılır ve ardından uygun şekilde eşleşen antikolarla bir hedef proteinin saptanması gerçekleştirilmektedir. Western blotlama; numune hazırlama, jel elektroforezi, blotlama (veya transfer), bloklama, antikor inkübasyonu ve görüntüleme olmak üzere 6 temel adımdan meydana gelmektedir (Pal, 2022).

#### 3.4.1. Hücre Lizatların Hazırlanması

Hücre lizati hazırlamak amacıyla NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattından 2 kontrol ve 2 doz uygulama grubu olmak üzere T25 flasklara  $8,5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 24 saat  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ortamlı etüvde inkübe edildi. Sürenin sonunda eski besiyerleri uzaklaştırıldı. Kontrol gruplarına besiyeri eklendi. Doz uygulama gruplarına ise MTT testi ile belirlenen  $\text{IC}_{50}$  değeri olan 900  $\mu\text{g/ml}$  48 nm AuNP, 750  $\mu\text{g/ml}$  31 nm AuNP, 650  $\mu\text{g/ml}$  12 nm AuNP, 70  $\mu\text{M}$  Ekstrakt ve 60  $\mu\text{M}$  Celecoxib dozu uygulandı ve 24 saat  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ortamlı etüvde inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda hücreler kendi besiyerinde hücre kazıyıcı ile kaldırılarak santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra PBS eklenerek yıkama yapıldı. Yıkama işlemi 2 kez tekrar edildi. Yıkama işlemi sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı, hücre peleti  $2 \times 10^7/\text{ml}$  oranına uygun olarak Ripa Lysis Buffer System (Santa Cruz, sc-24948) ile süspanse edildi ve proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Süspansiyon eppendorf tüplere alındı ve 12.000 G'de 20 dk santrifüj edildi ( $+4^\circ\text{C}$ ). Hücre lizatları çalışmalarda kullanılmak üzere  $-80^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

#### 3.4.2. Protein Miktar Analizi

Jele yüklenecek protein miktarının belirlenmesi için BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23225) ile miktar ölçüm analizi yapıldı.

Hücrelerin protein sonuçlarını hesaplayabilmek için kit prosedürüne göre 125, 250, 500, 750, 1000, 1500  $\mu\text{g/ml}$  albümin standartları hazırlandı. Protein reaktifi, A reaktifi ve B reaktifi ile 50:1 oranında hazırlandı.

Kullanılacak solüsyonlar hazırlandıktan sonra 96 well plate içerisine her kuyucuğa 100 µl protein reaktifi eklendi ve üzerlerine 5 µl protein hücre lizatı ilave edilerek pipetaj yapıldı. 96 well plate 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda ELISA okuyucuda (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) 562 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Albümin standartlarının sonuçlarına göre kalibrasyon grafiği çizilerek bulunan grafik denklemine göre her numune için jele yüklenecek protein miktarı hesaplandı. Protein miktarı 20 ng'a eşitlendi.

### 3.4.3. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması ve Elektroforez

Proteinleri moleküler boyutlarına göre ayırmak amacıyla %4'lük üst jel ve %10'luk alt jel Tablo 3.7'de belirtilen miktarlarda hazırlandı.

**Tablo 3.7.** SDS Page Jel İçeriği

<b>Alt Jel (%10)</b>	Akrilamid/Bisakrilamid 1,5 M Tris Base (pH:8.8) %10 Amonyum Persülfat TEMED dH <sub>2</sub> O
<b>Üst Jel (%4)</b>	Akrilamid/Bisakrilamid 0,5 M Tris Base (pH:6.8) %10 Amonyum Persülfat TEMED dH <sub>2</sub> O

Öncelikle %10'luk alt jel hazırlanarak pipet ile jel kalıbı içerisine eklendi. Jelin polimerizasyonu için 40 dk beklenildi. Alt jel polimerize olduktan sonra %4'lük üst jel hazırlandı ve pipet yardımı ile jel kalıbına ilave edildi. Kuyucukların oluşması için tarak takıldı ve üst jelin polimerizasyon için 20 dk beklenildi. Süre sonunda jelden tarak çıkartıldı ve jel kalıbı jel kasedine yerleştirildi. Jel kasetleri elektroforez tankına yerleştirildi ve üzerine köpük oluşmayacak şekilde Running Buffer (Tris-Base/Glisin, %10 SDS, dH<sub>2</sub>O) eklendi.

Kuyucuklara protein marker (ABCAM, #AB116028) ve 20 ng'a ayarlanan protein örnekleri yüklendi. Jel 70 V'da 10 dakika ve 110 V'da 1 saat 30 dakika yürümeye bırakıldı.

#### **3.4.4. Proteinlerin Membrana Transferi**

Transfer için kullanılacak olan Poliviniliden Diflorür (PVDF; Bio-Rad #1620177) membran 10 saniye Metanol (Merck, # 106007) ile muamele edilip hızlıca Transfer Buffer (Tris-Base/Glisin, %20 v/v Metanol) içerisine alındı. Çalkalayıcıya alınarak 5 dakika bekletildi. Transfer kasetine ilk önce blot paper (Bio-Rad #1703968) yerleştirilip bir miktar transfer buffer ile ıslatıldı. Sonrasında blot paper üzerine sırasıyla PVDF membran ve jel yerleştirildi. Jelin üzeri blot paper ile kapatılarak bir miktar ıslatıldı ve ruler ile kabarcık kalmayacak şekilde üzerinden geçildi. Kaset kapatıldıktan sonra transfer kaseti cihaza takıldı. 100 V, 200 mA'de 15 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

#### **3.4.5. Bloklama**

Bloklama işlemi, proteinlerin transferinden sonra membranla antikorlar arasındaki spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmek amacıyla uygulandı. Transfer kasedinden çıkarılan PVDF membran %1 Bovine Serum Albumin (BSA; AppliChem #A1391) ve 1X TBST (Tween20, 10X Tris-Base/NaCl, dH<sub>2</sub>O) ile hazırlanan bloklama solüsyonu içerisine konuldu ve oda sıcaklığında olmak üzere 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Bloklamadan sonra membrana 3 kez 1X TBST ile yıkama işlemi yapıldı.

#### **3.4.6. Primer ve Sekonder Antikor İnkübasyonu**

Primer antikor (MMP-2 Antibody sc-13594, Santa Cruz) 1X TBST ve %1 BSA ile 1:8000 oranında dilüe edilerek hazırlandı ve membran üzerine ilave edildi. Membran primer antikor solüsyonu ile gece boyunca +4°C'de muamele edildi. Primer antikor muamelesinden sonra tutunmayan fazla antikorları uzaklaştırmak amacıyla 3 kez 1X TBST ile çalkalayıcıda 5 dk yıkama işlemi yapıldı. Horse-radish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikor (m-IgGκ BP-HRP sc-516102, Santa Cruz) 1X TBST ve %1 BSA ile dilüe edilerek hazırlandı ve membran üzerine eklendi. Membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Muameleden sonra fazla antikorları uzaklaştırmak amacıyla 3 kez 1X TBST ile çalkalayıcıda 5 dk yıkama işlemi yapıldı.

#### **3.4.7. ECL ile Görüntüleme**

HRP konjuge sekonder antikor, hidrojen peroksit varlığında, ECL Substrat Kit (Bio-Rad #1705062) içerisinde bulunan luminol substratını kimyasal olarak oksitleyerek ışığa yapmasını sağlamaktadır. Bu ışığa görüntüleme cihazları veya özel filmler ile saptanabilmektedir. Western Peroksit Reaktif ve Western Luminol/Arttırıcı Reaktifin 1:1 oranında karıştırılmasıyla ECL Substrat solüsyonu hazırlandı.

Karanlık ortamda membran üzerine ECL solüsyonu eklendi. BIORAD ChemiDoc Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad Laboratories, ABD) ile kemilüminesans olarak görüntüleme yapıldı.

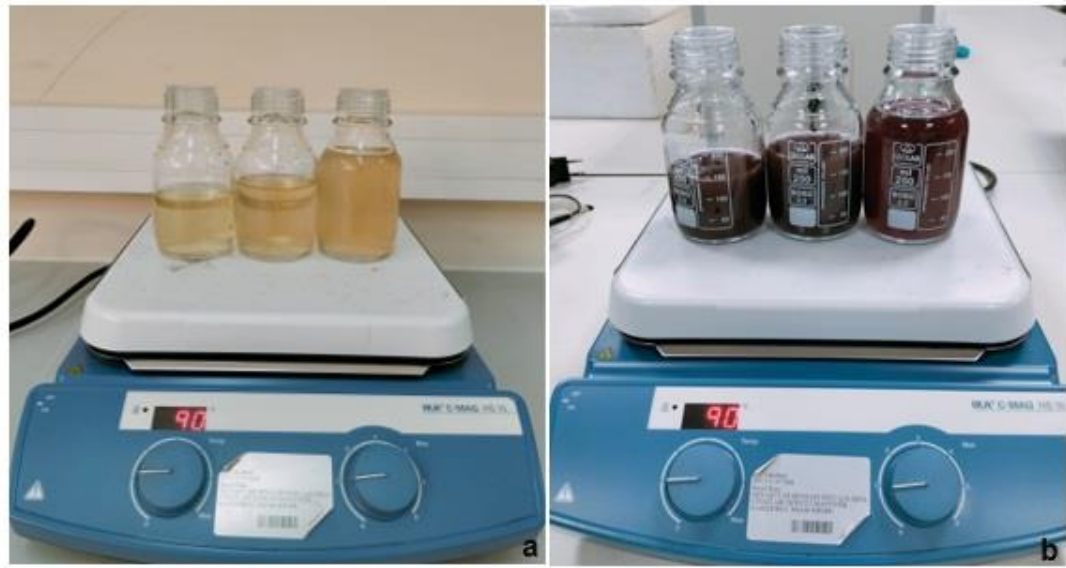
### **3.5. İstatistiksel Analiz**

MTT, qRT-PCR ve Western Blot analizleri sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizleri gruplar içi farklılık student's t testi (two-tailed distribution) ve gruplar arası farklılık varyans analizi (ANOVA) uygulanarak yapıldı. Anlamlılık p değeri hesaplanarak incelendi. İstatistiksel analiz GraphPad Prism® V.9.5.1 (GraphPad Software) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Altın Nanopartikül Sentezi

Altın sulu çözeltisi 3 ayrı otoklav şişesine alınarak üzerlerine sırasıyla farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktı oda sıcaklığında eklenmiştir. Belirli süreler sonunda çözeltinin rengi sarıdan yakut kırmızısına dönüşmüştür (Şekil 4.1). Yakut kırmızısı rengine dönüşüm altın nanopartiküllerinin oluştuğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 4.1.** Zamana bağlı renk değişimi. **a.** Altın sulu çözeltisi ve ekstrakt karışımının ilk hali, **b.** Süre sonunda yakut kırmızısı renginin gözlemlenmesi.

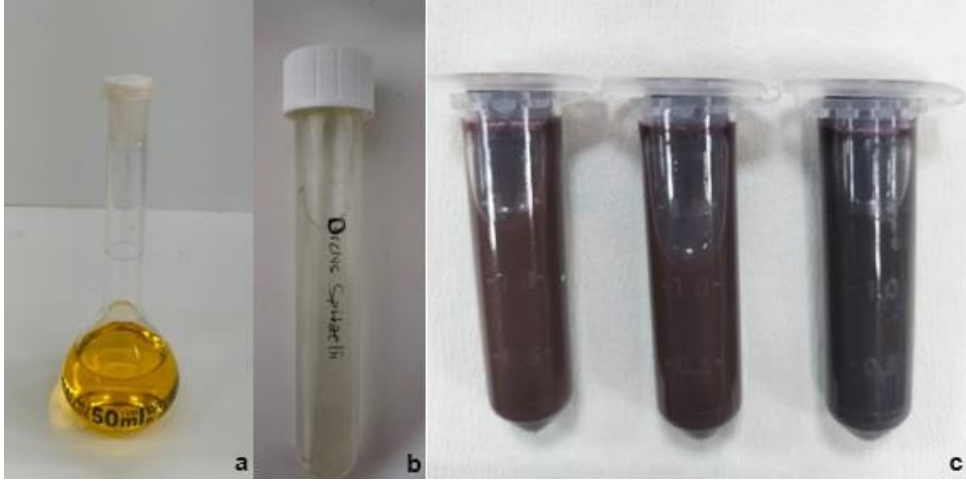
AuNP'lerin sentezi için, önceden farklı pH değerlerinde hazırlanan 0.1, 0.01 ve 0.001 M 100'er ml Tetrakloroaurik Asit sulu çözeltisi ile 40, 80 ve 160 ml olmak üzere 3 farklı miktarda Salep bitki ekstraktı otoklav şişelerine sırasıyla eklenmiştir. Otoklav şişeleri 90 °C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcıda reaksiyona bırakılmıştır. Farklı sentez parametreleri kullanılarak altın sulu çözeltisi ile elde edilen nanopartiküllerin, UV–Vis spektrofotometresinde yarım saatlik zaman dilimlerinde ölçümleri alınarak absorpsiyon spektrumları elde edilmiştir. Tablo 4.1' de çalışmada kullanılan sentez parametreleri görülmektedir.

**Tablo 4.1.** Sentezlenen altın nanopartiküllerin sentez parametreleri

Numune No	Tetrakloroaurik Asit Miktarı	Bitki Ekstraktı	pH	Sıcaklık
1	100 ml	40 ml	5	90°C
2	100 ml	80 ml	5	90°C
3	100 ml	160 ml	5	90°C
4	100 ml	40 ml	7	90°C
5	100 ml	80 ml	7	90°C
6	100 ml	160 ml	7	90°C
7	100 ml	40 ml	9	90°C
8	100 ml	80 ml	9	90°C
9	100 ml	160 ml	9	90°C

AuNP'lerin yeşil sentez reaksiyonu çok hassastır ve reaksiyon süresi, Tetrakloroaurik Asit konsantrasyonu, ekstrakt hacmi ve reaksiyon sıcaklığı gibi bazı önemli değişkenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu değişkenler AuNP'lerin boyut, şekil, verim ve aglomerasyon durumunun kalitatif olarak belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada, AuNP'lerin yeşil sentez reaksiyonu için bu parametrelerin etkisi incelenerek uygun koşullar belirlenmiştir.

İlk olarak, pH reaksiyon ortamının kimyasını etkilediği için bu değişkenin nanopartikül oluşumundaki etkisini göstermek amacıyla sentez ortamında 5, 7 ve 9 olmak üzere üç farklı pH değeri kullanılmıştır. Ayrıca 0.1, 0.01 ve 0.001 M Tetrakloroaurik Asit konsantrasyonu, metal iyon konsantrasyonunun nanopartikül sentezindeki etkisini göstermek amacıyla kullanılmıştır. Ekstrakt konsantrasyonu olarak ise 40 mL, 80 mL ve 160 mL olmak üzere üç farklı konsantrasyon seçilmiştir. Sentez aşamasında UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyları arasında ölçüm alınarak absorbans değerleri incelenmiştir.



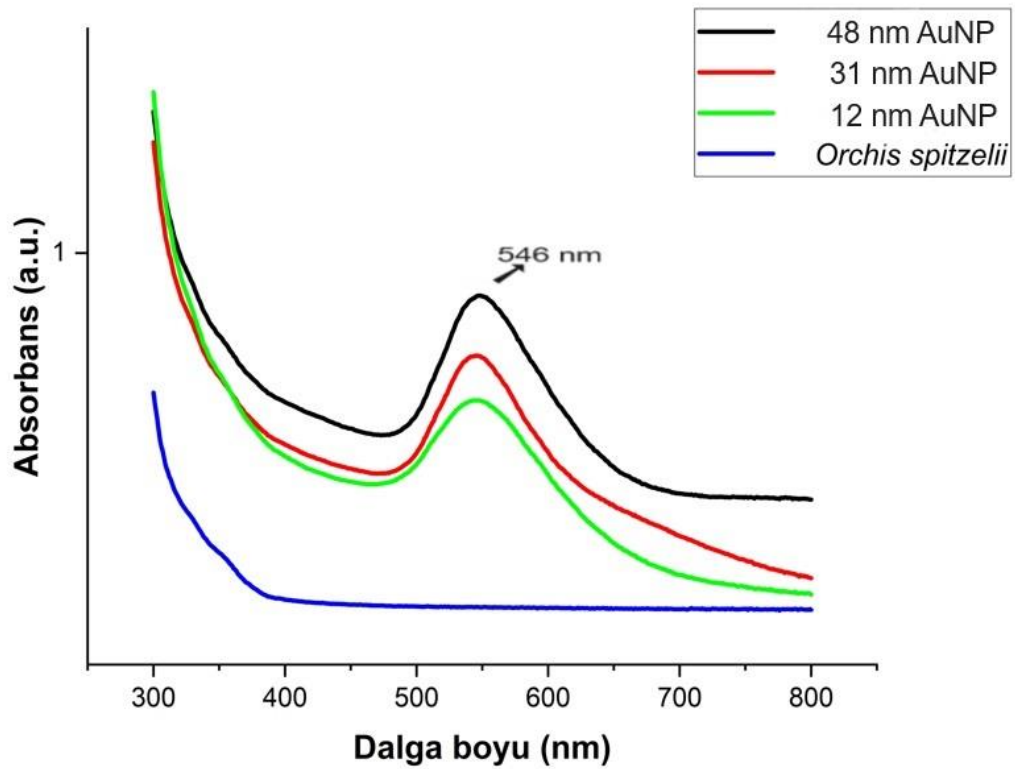
**Şekil 4.2.** Altın nanopartikül sentezinin gösterimi. **a.** Tetrakloroaurik Asit çözeltisi, **b.** Salep (*Orchis Spitzelii*) sulu ekstraktı, **c.** Sentezlenen Altın Nanopartiküller.

## 4.2. Altın Nanopartikül Karakterizasyonu

### 4.2.1. Altın Nanopartiküllerin UV-Vis Karakterizasyonu

Sentezlenen altın nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonans (SPR) özelliklerini belirlemek amacıyla UV-Vis spektrometresi kullanılmıştır. Çalışmadaki UV-Vis spektrum analizi Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Sentez sırasında numunelerin absorbans ölçümleri doğrudan nanopartikül boyutuyla ilgili olan UV-Vis spektroskopisi ile 200 ile 800 nm dalga boyu arasında 30 dakikalık aralıklarla takip edilmiştir ve pik değerinde literatürle benzer pik seviyesine ulaşılması ile sentez işlemi sonlandırılmıştır. UV-Vis spektroskopisinde, belirli bir dalga boyunda bir ışık kaynağı tarafından üretilen uyarım, dalga boyunun yüzey plazmon rezonansı (SPR) olarak adlandırılan karakteristik bir tepe noktasına sahiptir. Metalik NP'lerin absorpsiyon spektrumundaki SPR bandı, bunların en ayırt edici özelliklerinden biridir. Bu işlem AuNP'lerin kinetiğini ve oluşum hızını incelemek için önemlidir (Amendola ve Meneghetti, 2009; Noruzi, Zare ve Davoodi, 2012).

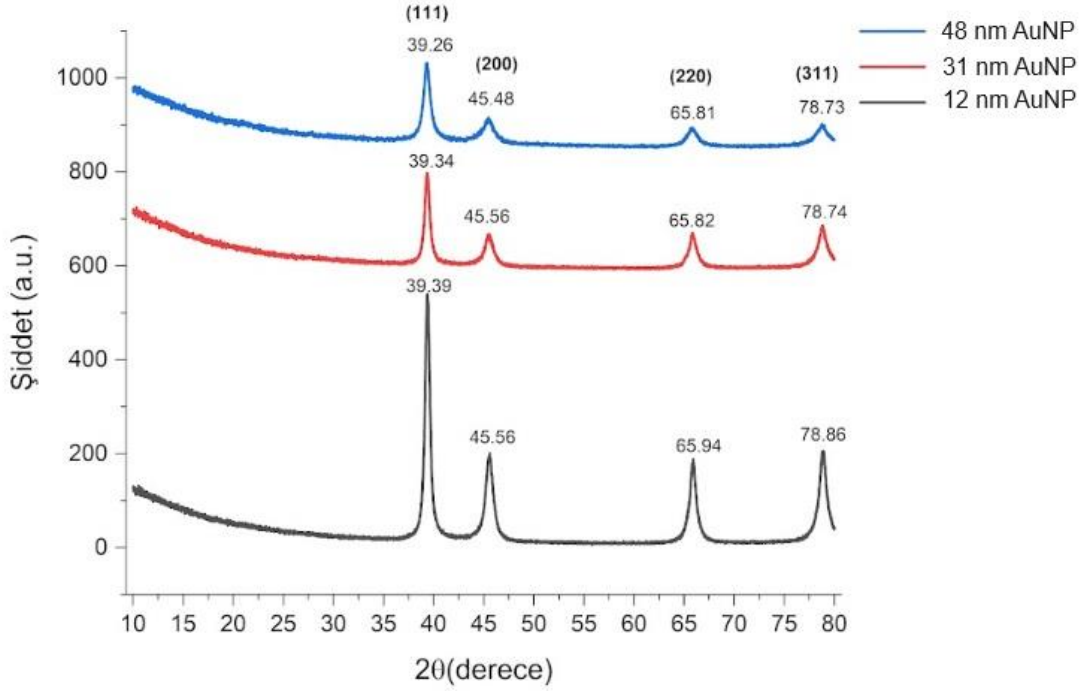


Şekil 4.3. AuNP ve ekstraktın zamana bağlı UV-Vis spektrumu değişimi

Çalışmada yapılan sentezler sonucunda en iyi pik değeri pH:5 0.001 M Tetrakloroaurik Asit konsantrasyonunda, 90°C sıcaklığında elde edilmiştir. En iyi pik değeri 546 nm dalga boyunda 5 saat 30 dakika sonunda elde edilmiştir (Şekil 4.3). Altın sulu çözeltisinin konsantrasyonu düşüldükçe sentez hızının arttığı ve sentez süresinin düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar altın nanopartiküller ile yapılan çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir (Hosny, Fawzy, Abdelfatah, Fawzy ve Eltaweil, 2021).

#### 4.2.3. Altın Nanopartiküllerin XRD ve FTIR Analizi

Bu çalışmadaki XRD analizi, sentezlenen altın nanopartiküllerin kristal yapısını ve elementel bileşimini doğrulamak amacıyla Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM)'nde hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. XRD paterni 10°-80° arasında 2θ aralığında 0,02 adım büyüklüğü ile çalışıldı. 48nm AuNP için 39,26°, 45,48°, 65,81°, 78,73° da gözlemlenen pikler sırasıyla (111), (200), (220) ve (311)'e karşılık gelmektedir. 31 nm AuNP için 39,34°, 45,56°, 65,82°, 78,74° da gözlemlenen pikler sırasıyla (111), (200), (220) ve (311)'e karşılık gelmektedir. 12 nm AuNP için 39,39°, 45,56°, 65,94°, 78,86° da gözlemlenen pikler sırasıyla (111), (200), (220) ve (311)'e karşılık gelmektedir (Şekil 4.4).

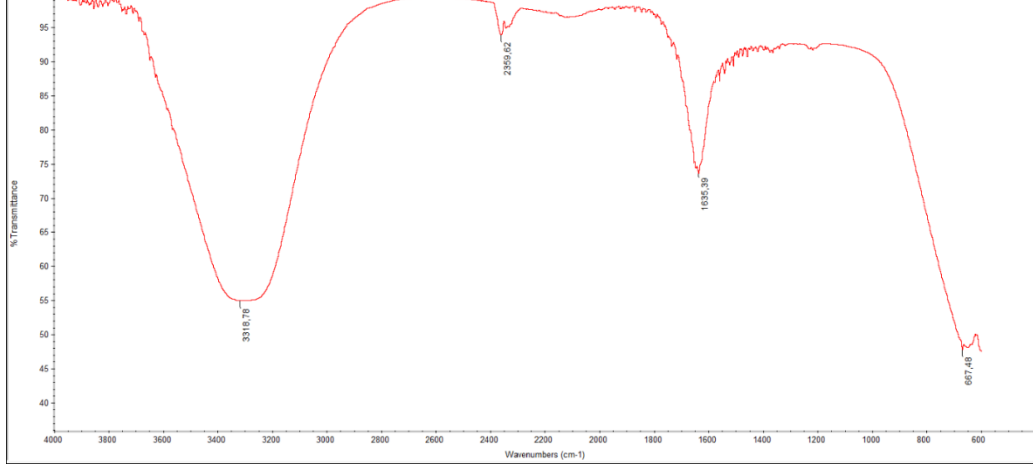


Şekil 4.4. Sentezlenen altın nanopartiküllerin XRD analizi

Sentezlenen AuNP'lerin XRD spektrumu, karakteristik Bragg kırınım planlarının metalik yüzey merkezli kübik (fcc) yapısıyla iyi bir uyum içinde olduğu gözlemlenmiştir. Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi (JCPDS) dosya no:04-0784 veri tabanının eşleşmesinde metalik altının kristal yapısını ortaya çıkarmıştır.

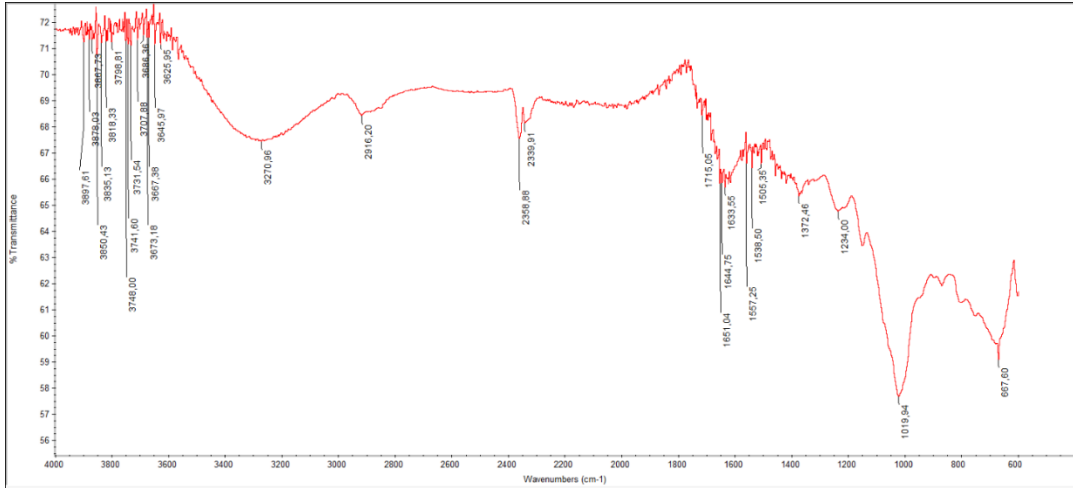
Genellikle malzemenin belirli bir fazının genişliği, o malzemenin ortalama kristalit boyutuyla doğru orantılıdır. Kristalit boyutunu gösteren daha geniş tepe noktaları küçüktür (Srivastava, Sahu ve Misra, 2018). Bu durum Salep ekstraktı konsantrasyonu arttıkça Tam Genişlik Yarı Maksimum (FWHM) değerinin artmasıyla birlikte partikül boyutunun küçüldüğü göstermektedir. Bu XRD deseninden, daha küçük parçacık boyutuna bağlı olarak tepe noktalarında genişleme meydana gelmekte ve bu, deneysel koşulların kristallerin çekirdeklenmesi ve büyümesi üzerindeki etkilerini yansıtmaktadır (Becheri ve Dürr, 2008). Kısacası ekstrakt konsantrasyonu arttıkça, reaksiyon ortamındaki AuNP'lerde FWHM değeri artmıştır. FWHM değeri artmasıyla hazırlanan nanopartiküllerin parçacık boyutu da azalmaktadır.

Çalışmadaki FTIR analizi Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji bölümü laboratuvarında, Salep ekstraktı ve AuNP'lerde bulunan fonksiyonel grupları saptamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Salep FTIR spektrumları bantları 3318.78, 2359.62, 1635.39 ve 667.48  $\text{cm}^{-1}$  'de elde edildi (Şekil 4.5.).



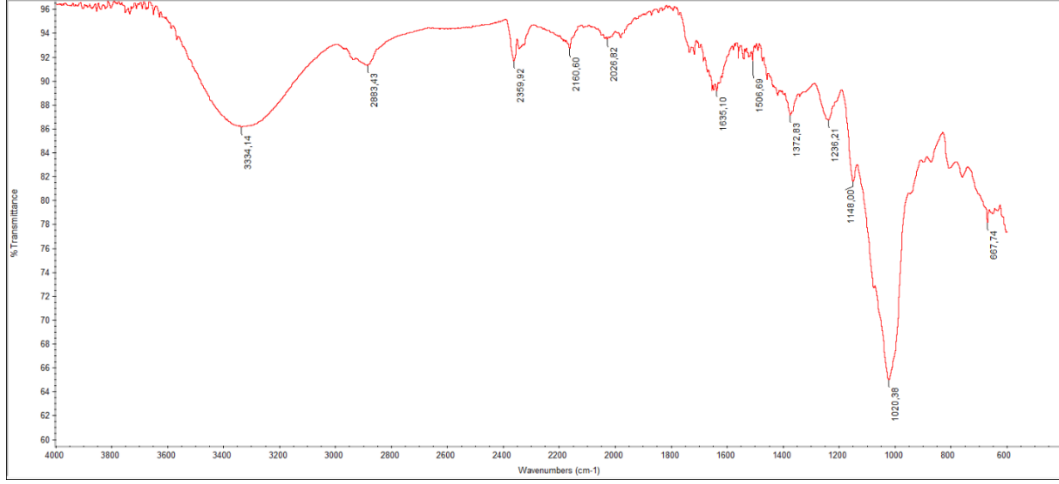
Şekil 4.5. Salep ekstraktının FTIR spektrum analizi

48 nm AuNP FTIR spektrumları bantları 3270.96, 2916.20, 2358.88, 2339.91, 1715.05, 1651.04, 1644.75, 1633.55, 1557.25, 1538.50, 1505.35, 1372.46, 1234.00, 1019.94 ve 667.60  $\text{cm}^{-1}$  'de elde edildi (Şekil 4.6.).



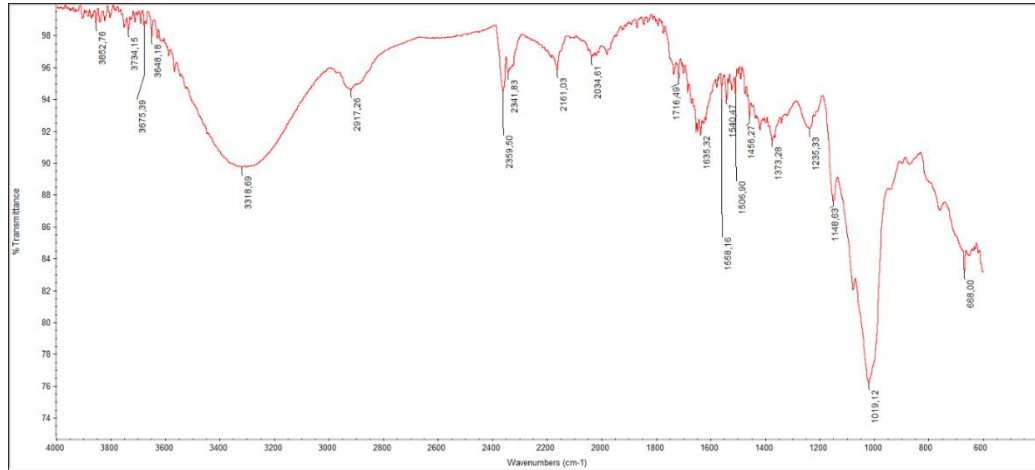
Şekil 4.6. 48 nm AuNP'ün FTIR spektrum analizi

31 nm AuNP FTIR spektrumları bantları 3334.14, 2883.43, 2359.92, 2160.60, 2026.82, 1635.10, 1506.69, 1372.83, 1236.21, 1148.00, 1020.38 ve 667.74  $\text{cm}^{-1}$  'de elde edildi (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. 31 nm AuNP'ün FTIR spektrum analizi

12 nm AuNP FTIR spektrumları bantları 3852.76, 3734.15, 3675.39, 3648.18, 3318.69, 2917.26, 2359.50, 2341.83, 2161.03, 2034.61, 1716.49, 1635.32, 1558.16, 1540.47, 1506.90, 1456.27, 1373.28, 1235.33, 1148.63, 1019.12 ve 668  $\text{cm}^{-1}$  'de elde edildi (Şekil 4.8.).



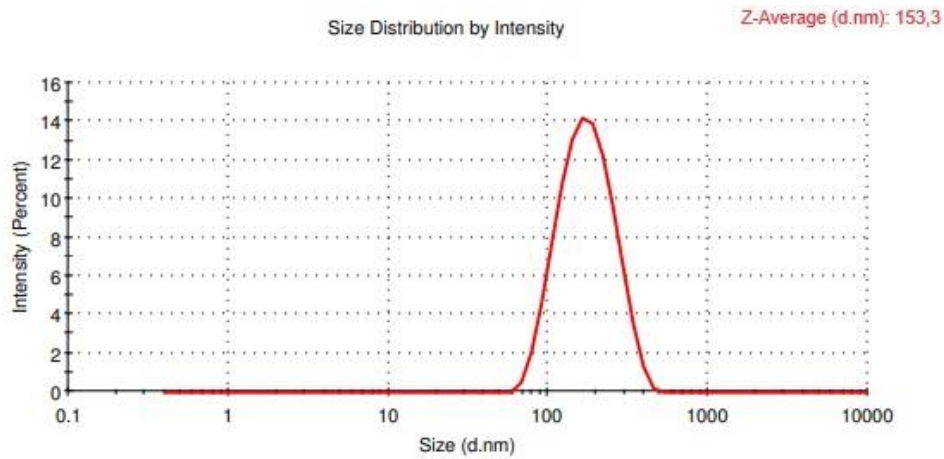
Şekil 4.8. 12 nm AuNP'ün FTIR spektrum analizi

Salep ekstraktında gözlemlenen 3318.78  $\text{cm}^{-1}$ 'deki güçlü ve geniş bant, polisakarit substratındaki -OH ve -COOH gruplarının gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1635  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki bant, glikomannan omurgasındaki C=O grubunun gerilmesine atfedilmektedir. Bu karakteristik zirvelerin tümü, AuNP'lerde daha yüksek dalga boylarına doğru hafif bir kayma göstermiştir. Bu kayma, altın nanoparçacıkları ile ekstrakt arasında mevcut olan elektron açısından zengin gruplar (C=O ve OH gibi) arasındaki koordinasyon bağlarının oluşumuna atfedilebilmektedir (Bardajee, Hooshyar ve Kabiri, 2012; Pourjavadi, Doulabi, Soleyman, Sharif ve Egthesadi, 2012).

Altın nanopartiküllerin IR spektrumunda C=O gerilmesinde  $1721\text{ cm}^{-1}$ 'de orta yoğunlukta bandın gözlenmesi, AuNP'lere bağlı  $-\text{COOH}$  grubunun varlığına işaret etmektedir (Philip, 2010). FTIR spektrumlarında  $660\text{-}670\text{ cm}^{-1}$  civarında gözlemlenen tepe noktaları manyetik çekirdekli tüm numunelerin spektrumunda görülmektedir (Hosseini ve diğerleri, 2020).

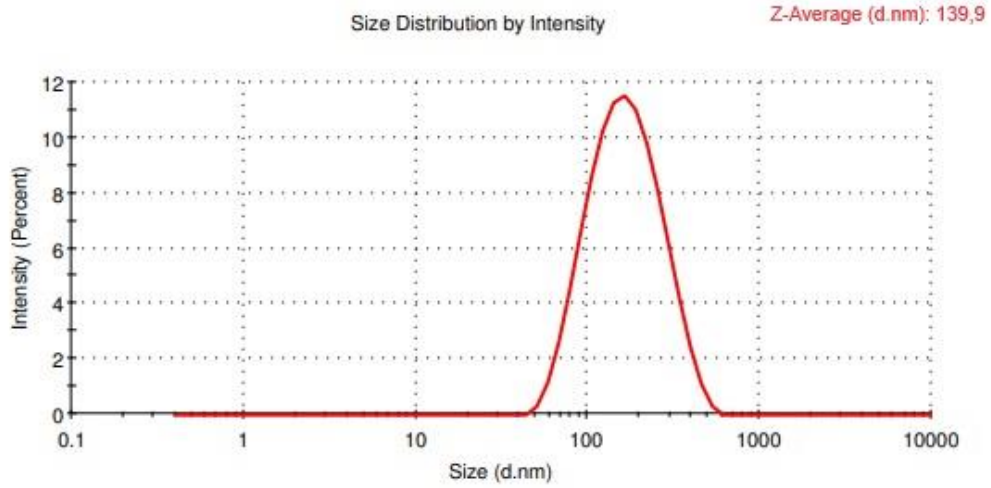
#### 4.2.3. Altın Nanopartiküllerin DLS ve Zeta Potansiyel Analizi

Bu çalışmadaki DLS analizi sentezlenen altın nanopartiküllerin boyut dağılımı hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesinde yaptırılmıştır.  $48\text{ nm}$  AuNP'lerin ( $90^\circ\text{C}$  pH 5  $0.001\text{ M}$  Tetrakloroaurik Asit ve  $40\text{ mL}$  bitki ekstraktı ile gerçekleştirilen) DLS diyagramı Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Sonuçlar, nanopartikülün ortalama boyutunun  $153,3\text{ nm}$  olduğunu göstermiştir. Bu sentez koşullarında nanopartiküllerin polidispersite indeksi (PDI) değerinin  $0.170$  olduğu bulunmuştur.



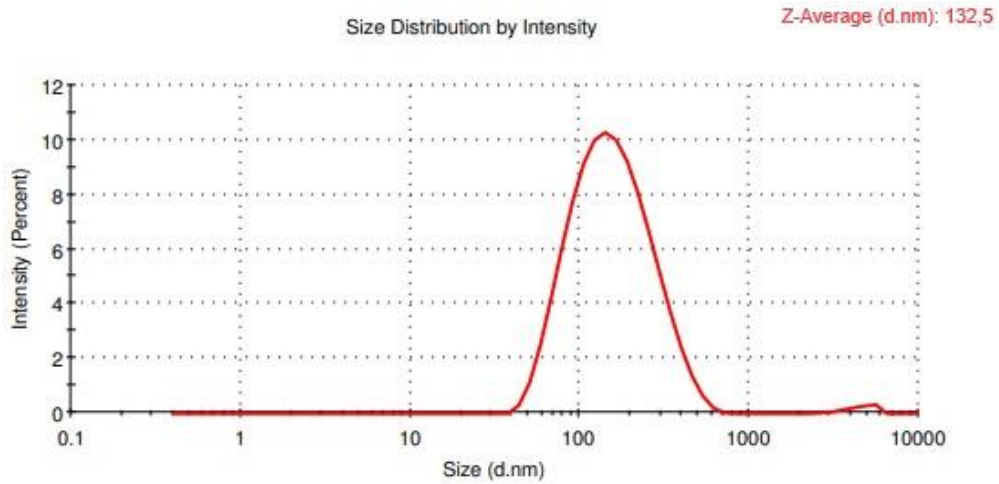
Şekil 4.9.  $48\text{ nm}$  AuNP'ün DLS ile boyut analizi

$31\text{ nm}$  AuNP'lerin ( $90^\circ\text{C}$  pH 5  $0.001\text{ M}$  Tetrakloroaurik Asit ve  $80\text{ mL}$  bitki ekstraktı ile gerçekleştirilen) DLS diyagramı Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bu sentezde ekstrakt konsantrasyonunun artırılması ile nanopartikül ortalama boyutunun DLS analizinde  $139,9\text{ nm}$ 'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sentez koşullarında nanopartiküllerin PDI değerinin  $0.217$  olduğu bulunmuştur.



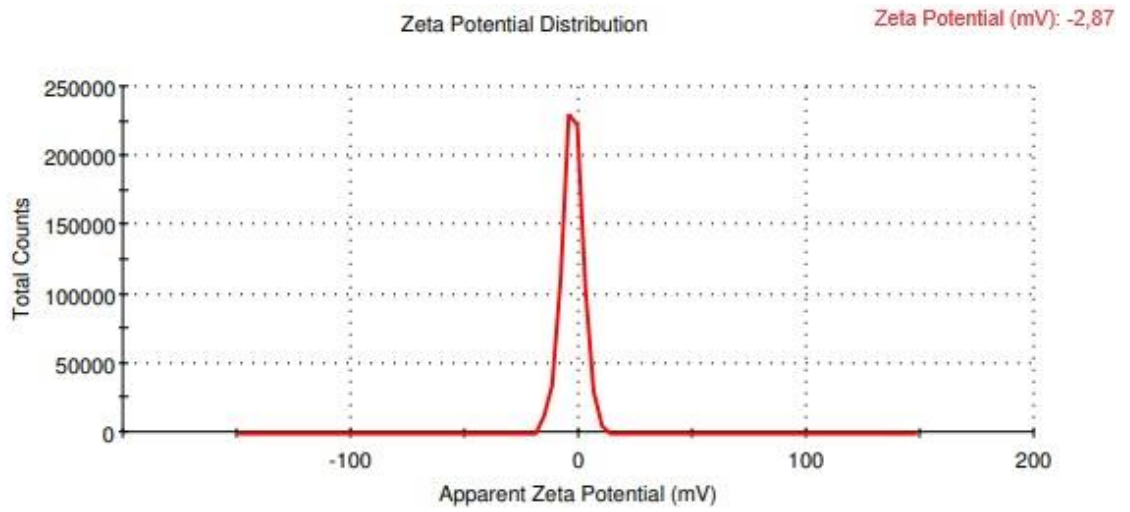
Şekil 4.10. 31 nm AuNP'ün DLS ile boyut analizi

12 nm AuNP'lerin (90°C pH 5 0.001 M Tetrakloroaurik Asit ve 160 mL bitki ekstraktı ile gerçekleştirilen) DLS diyagramı Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Bu sentezde ekstrakt konsantrasyonunun artırılması ile nanopartikül ortalama boyutunun DLS analizinde 132,5 nm boyutuna düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sentez koşullarında nanopartiküllerin PDI değerinin 0.235 olduğu bulunmuştur. PDI değerlerinin 0,3'ten küçük olması numunelerin parçacık boyutunun homojen dağıldığını ve kararlı bir yapıya sahip olduklarını göstermektedir (Bemidinezhad, Mirzavi, Gholamhosseinian, Gheybi ve Soukhtanloo, 2023).

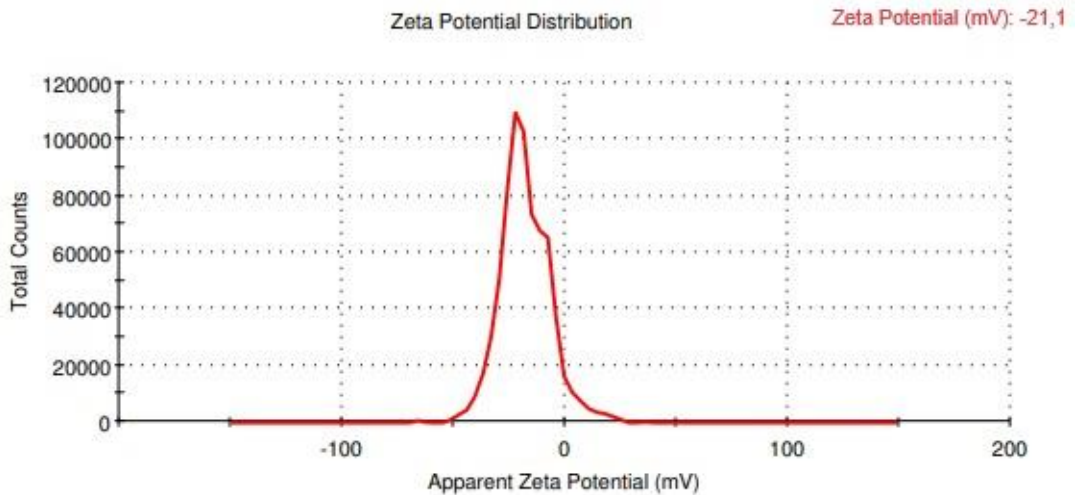


Şekil 4.11. 12 nm AuNP'ün DLS ile boyut analizi

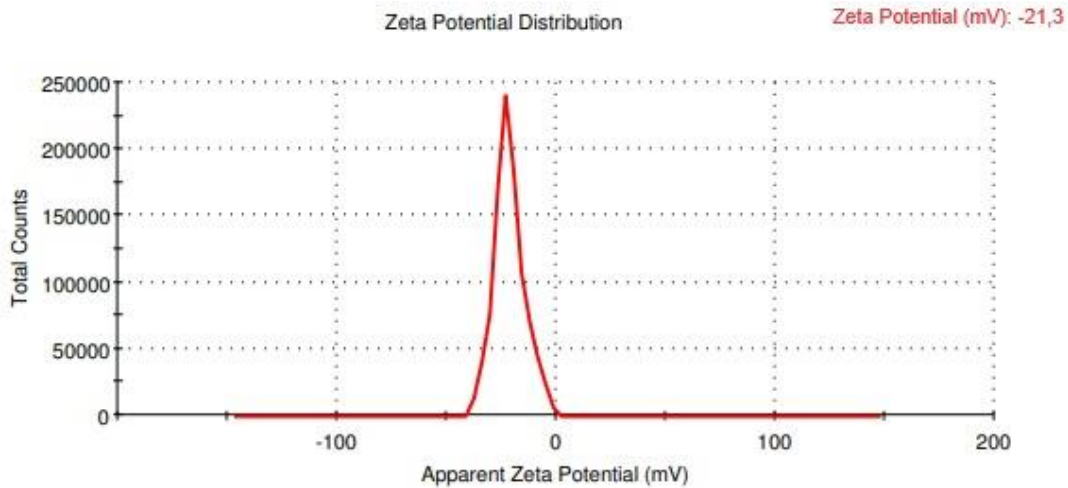
Bu çalışmadaki zeta potansiyel analizi, sentezlenen altın nanopartiküllerin yüzey yükü hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesinde yaptırılmıştır. 48 nm AuNP'ün, -2.87 (mV) zeta potansiyeline sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12). 31 nm AuNP'de ise ekstrakt konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak zeta potansiyel değeri -21.1 (mV) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13). Bu değişim ekstrakt konsantrasyonu artışı sonucunda zeta potansiyel değerinin keskin bir şekilde gerilediğini göstermiştir. 12 nm AuNP'de ise ekstrakt konsantrasyonun daha da artırılmasıyla zeta potansiyel değerinin 31 nm AuNP'e göre daha da düşerek -21.3 (mV)'a gerilediği tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.12. 48 nm AuNP'ün Zeta Potansiyel analizi



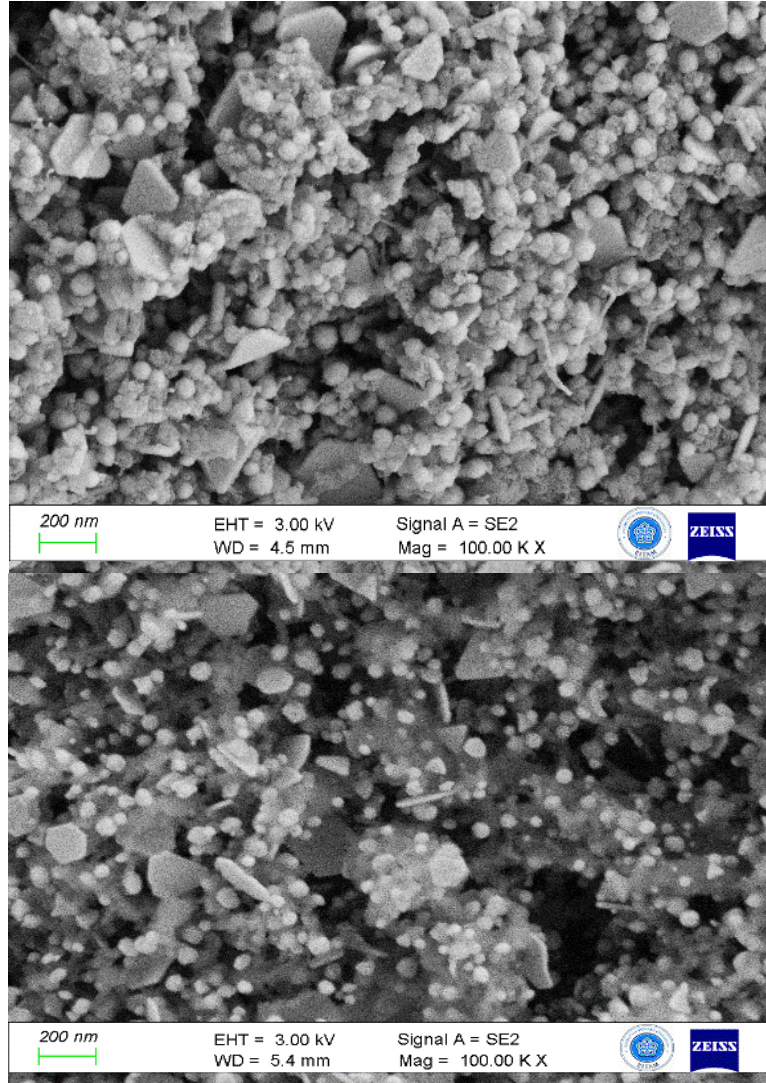
Şekil 4.13. 31 nm AuNP'ün Zeta Potansiyel analizi



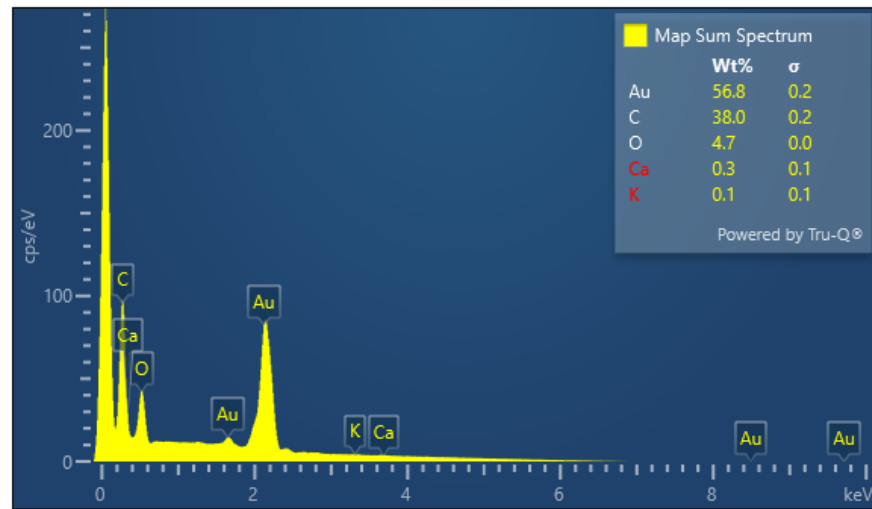
Şekil 4.14. 12 nm AuNP'ün Zeta Potansiyel analizi

#### 4.2.5. Altın Nanopartiküllerin FE-SEM/ EDX Karakterizasyonu

Bu çalışmadaki FE-SEM/EDX analizi, sentezlenen altın nanopartiküllerin yüzey morfolojisi hakkında bilgi edinmek amacıyla Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM)'nde hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Şekil 4.15 ve 4.16'da gösterilen FESEM-EDX analizi, 48 nm AuNP için altın içeriğinin varlığını göstermektedir. Sentezlenen 48 nm AuNP'ün EDX görüntüsü, altın elementin sinyallerini göstermiştir. EDX analizinde altın içeriğinin %56,8 oranında olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte EDX analizinde yer alan %38 C, %4.7 O, %0.3 Ca ve %0.1 K elementlerinin varlığının, salep sulu ekstraktından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca yeşil sentezlenen AuNP'lerin ağırlıklı olarak küresel, üçgen, yıldız ve heksagonal şekiller olduğu gözlemlenmiştir.

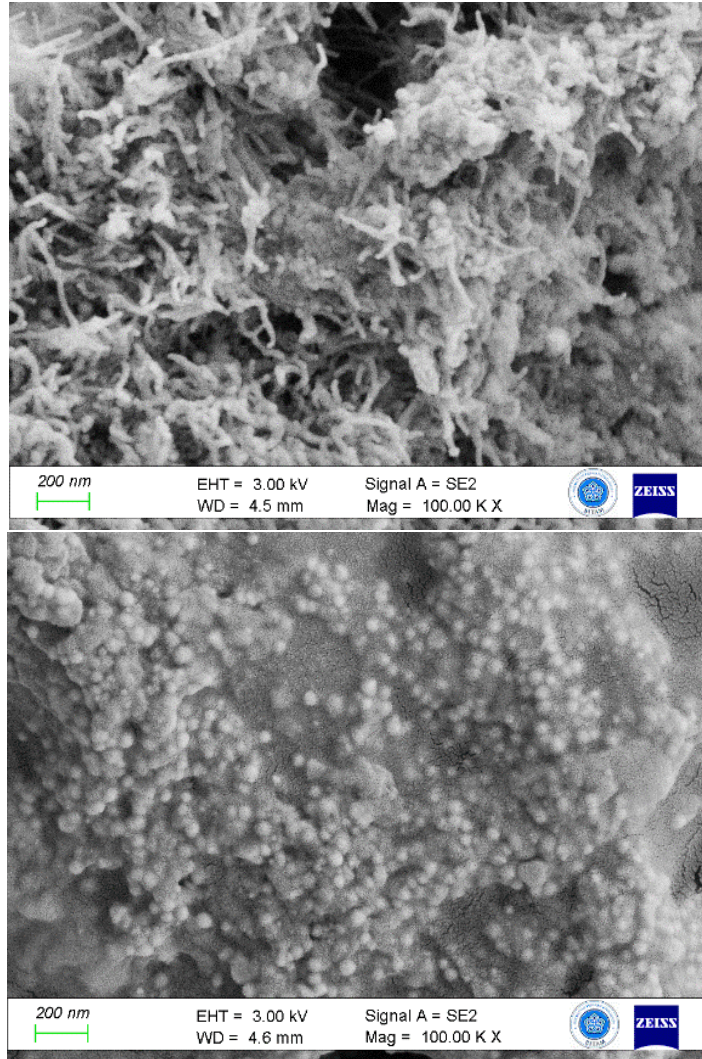


Şekil 4.15. Sentezlenen 48 nm AuNP'ün FESEM analiz sonucu

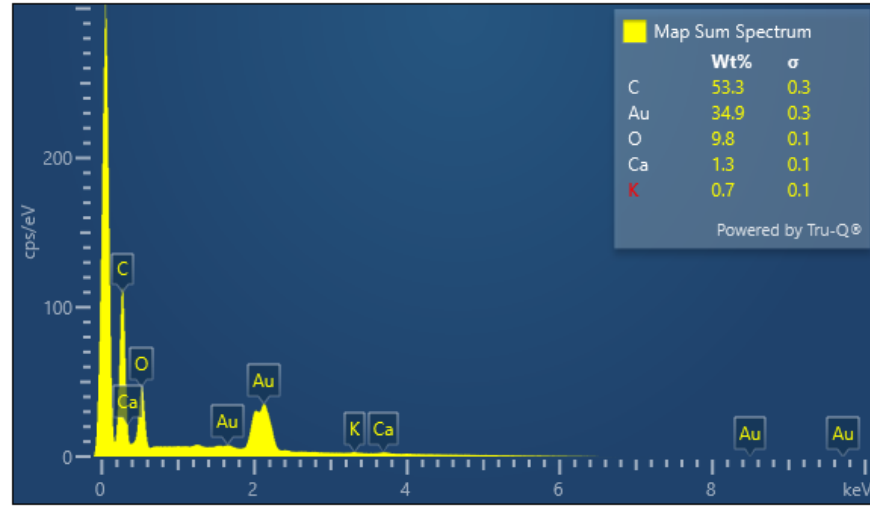


Şekil 4.16. 48 nm AuNP'ün EDX analizi

Şekil 4.17 ve 4.18’de gösterilen FESEM-EDX analizi, 31 nm AuNP için altın içeriğinin varlığını göstermektedir. Sentezlenen AuNP’lerin EDX görüntüsü, altın elementin sinyallerini göstermiştir. EDX analizinde altın içeriğinin %34,9 oranında olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte EDX analizinde yer alan %53.3 C, %9.8 O, %1.3 Ca ve %0.7 K elementlerinin varlığının, salep sulu ekstraktından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca yeşil sentezlenen AuNP’lerin ağırlıklı olarak küresel şekiller olduğu gözlemlenmiştir.

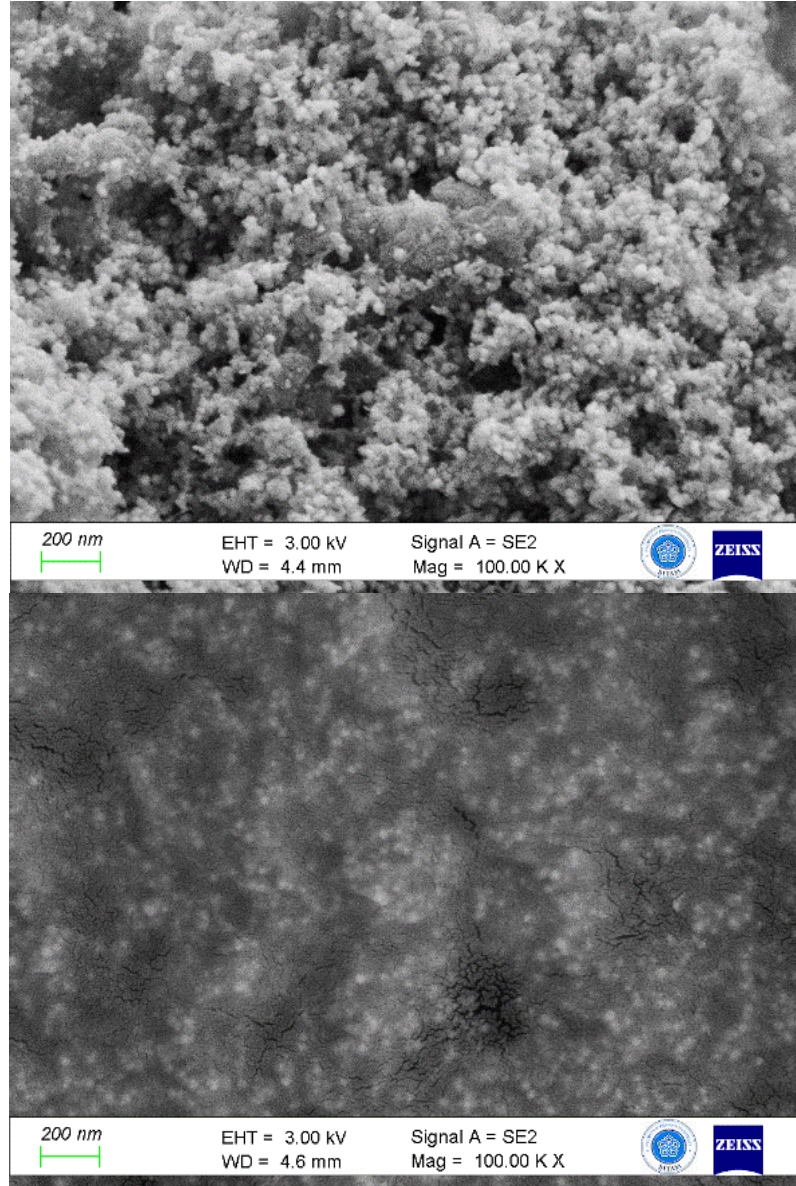


Şekil 4.17. Sentezlenen 31 nm AuNP’ün FESEM analiz sonucu

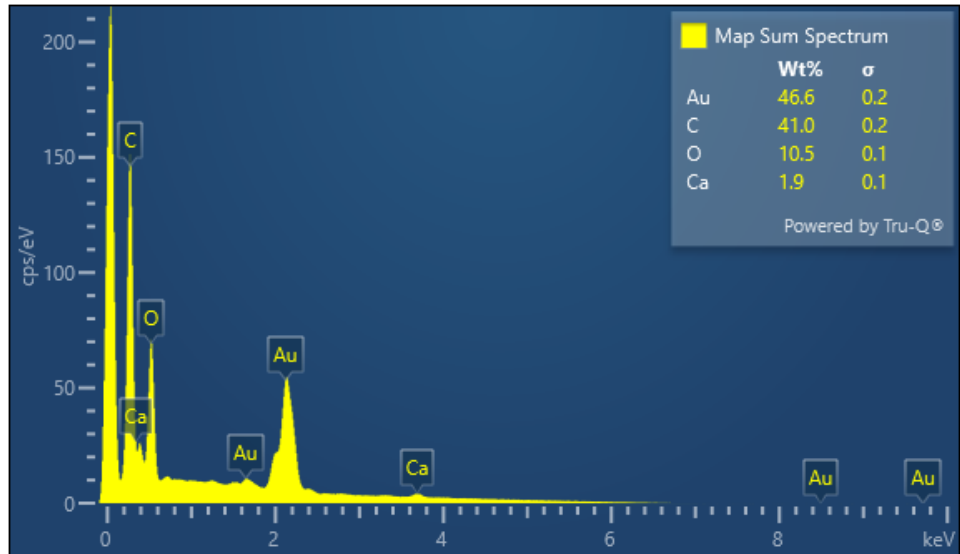


Şekil 4.18. Sentezlenen 31 nm AuNP'ün EDX analizi

Şekil 4.19 ve 4.20'de gösterilen FESEM-EDX analizi, 12 nm AuNP için altın içeriğinin varlığını göstermektedir. Sentezlenen AuNP'lerin EDX görüntüsü, altın elementin sinyallerini göstermiştir. EDX analizinde altın içeriğinin %46,6 oranında olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte EDX analizinde yer alan %41C, %10.5 O ve %1.9 Ca elementlerinin varlığının, salep sulu ekstraktından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca yeşil sentezlenmiş AuNP'lerin ağırlıklı olarak küresel şekiller olduğu gözlemlenmiştir.



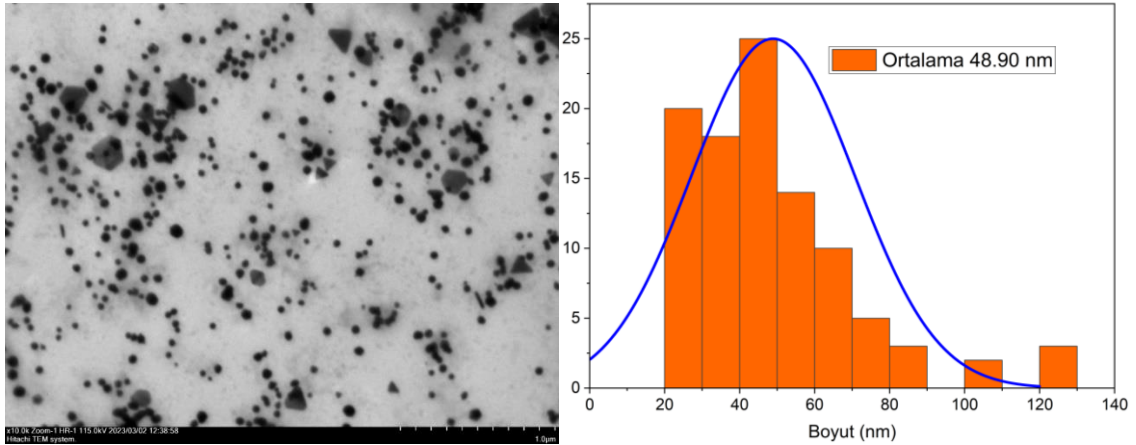
Şekil 4.19. Sentezlenen 12 nm AuNP'ün FESEM analiz sonucu



Şekil 4.20. Sentezlenen 12 nm AuNP'ün EDX analizi

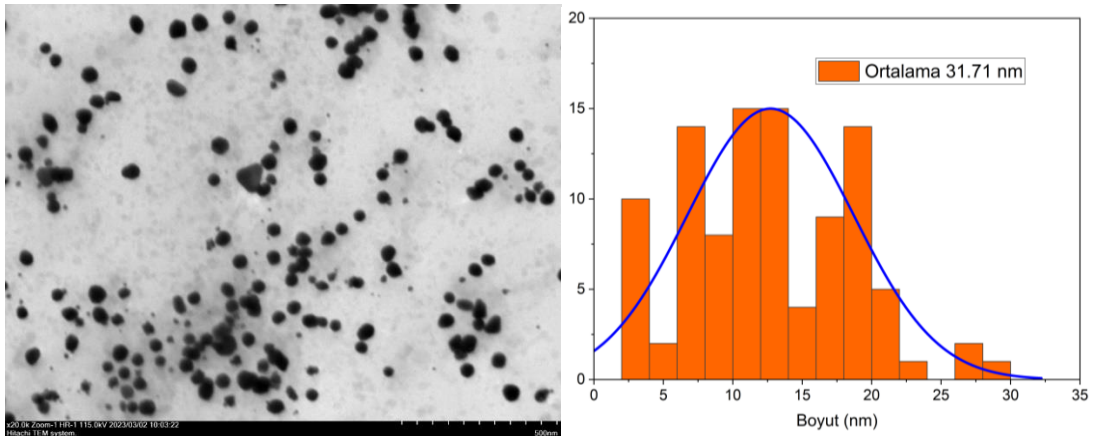
#### 4.2.6. Altın Nanopartiküllerin TEM Karakterizasyonu

Bu çalışmadaki TEM analizi, yeşil sentezlenen altın nanopartiküllerin boyut ve şekil yapısı hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'ne hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. 48 nm AuNP için TEM analizi sonucu küresel, oval, hekzagonal, beşgen, üçgen, yıldız ve nanorod gibi çeşitli şekillerde AuNP'lerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.21. ve Şekil 4.22).



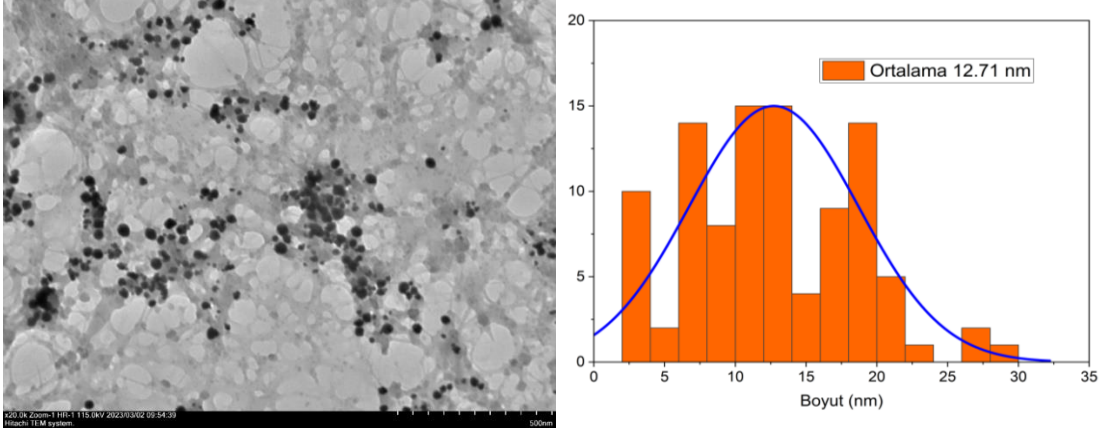
Şekil 4.22. Sentezlenen 48 nm AuNP'ün TEM analiz görüntüsü

31 nm AuNP'ün TEM analizi sonucu küresel, üçgen ve yıldız gibi çeşitli şekillerde AuNP'lerin varlığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Sentezlenen 31 nm AuNP'ün TEM analiz görüntüsü

12 nm AuNP'ün TEM analizi sonucu küresel AuNP'lerin varlığını ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. Sentezlenen 12 nm AuNP'ün TEM analiz görüntüsü

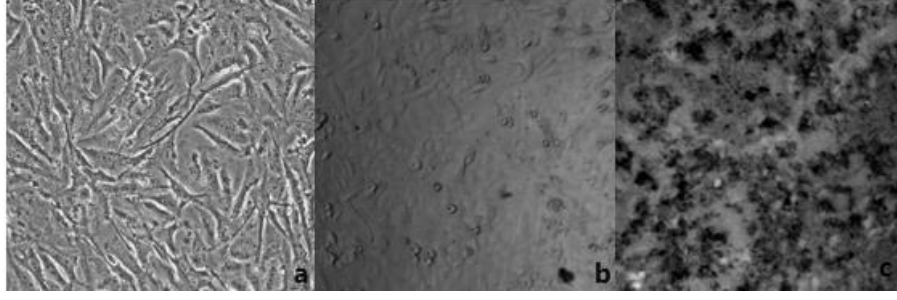
TEM analizi sonucunda özellikle, 48 nm AuNP'ün şekil bakımından çeşitlilik gösterdiği gözlemlenmiştir. Ekstrakt konsantrasyonu artışıyla morfolojilerinin daha küresel olduğu ve çeşitliliğin azaldığı gözlemlenmiştir.

Ekstrakt miktarı arttıkça nanopartiküllerin boyutlarının küçüldüğü gözlemlenmiştir. TEM analizine göre sentezlenen AuNP boyutları, ekstrakt konsantrasyonu artışına bağlı olarak sırasıyla  $48,909 \pm 2$ ,  $1,850$ ,  $31,005 \pm 15,371$  ve  $12,714 \pm 5,99$  olarak bulunmuştur.

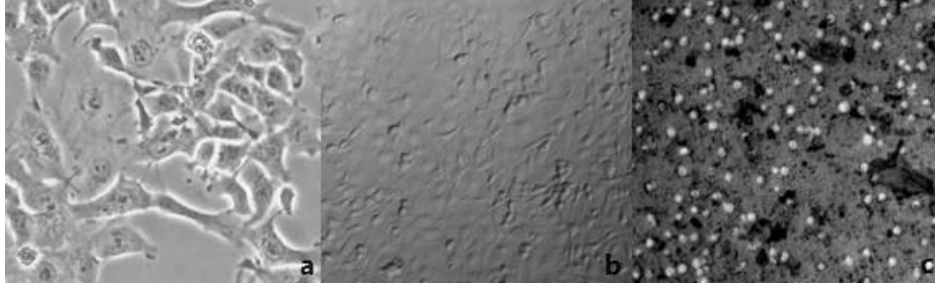
#### 4.3. Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstraktın NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattı Üzerindeki Morfoloji Değişiminin İncelenmesi

NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında AuNP, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt için belirlenen dozlar uygulandıktan 24 saat sonra hücreler inverted mikroskop altında 10X optik büyütmede görüntülenmiştir.

48 nm AuNP uygulaması sonucunda, uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre doz uygulanmış hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir. HUVEC hücre hattına kıyasla NCI-H441 hücre hattında hücre proliferasyonun daha çok etkilendiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte doz uygulaması sonrasında HUVEC hücreleri küresel bir morfoloji sergilemiştir.

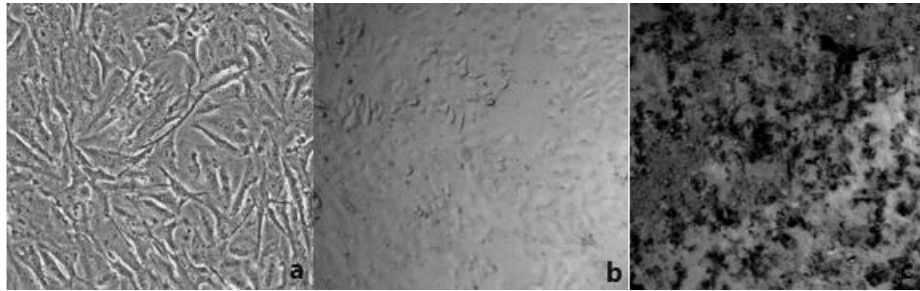


**Şekil.4.25.** NCI-H441 hücrelerinin 48 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500  $\mu$ M, c. 1500  $\mu$ M.



**Şekil.4.26.** HUVEC hücrelerinin 48 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500  $\mu$ M, c. 1500  $\mu$ M.

31 nm AuNP uygulaması sonucunda, uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre doz uygulanmış hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir. HUVEC hücre hattına kıyasla NCI-H441 hücre hattında hücre proliferasyonun daha çok etkilendiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte doz uygulaması sonrasında HUVEC hücreleri küresel bir morfoloji sergilemiştir.

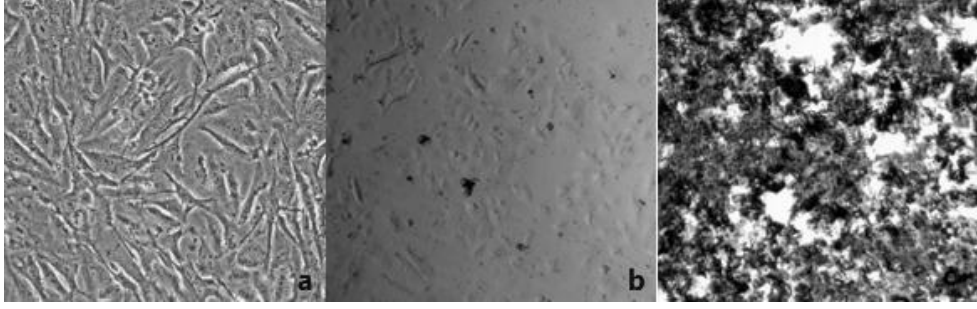


**Şekil.4.27.** NCI-H441 hücrelerinin 31 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500  $\mu$ M, c. 1500  $\mu$ M.

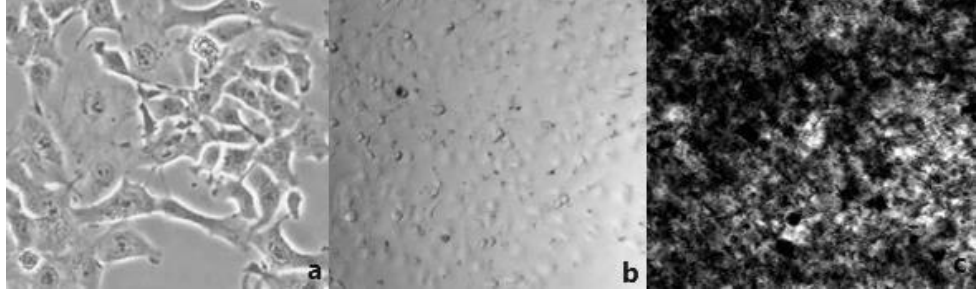


**Şekil.4.28.** HUVEC hücrelerinin 31 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500  $\mu$ M, c. 1500  $\mu$ M.

12 nm AuNP uygulaması sonucunda, uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre doz uygulanmış hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir. HUVEC hücre hattına kıyasla NCI-H441 hücre hattında hücre proliferasyonun daha çok etkilendiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte doz uygulaması sonrasında HUVEC hücreleri küresel bir morfoloji sergilemiştir.

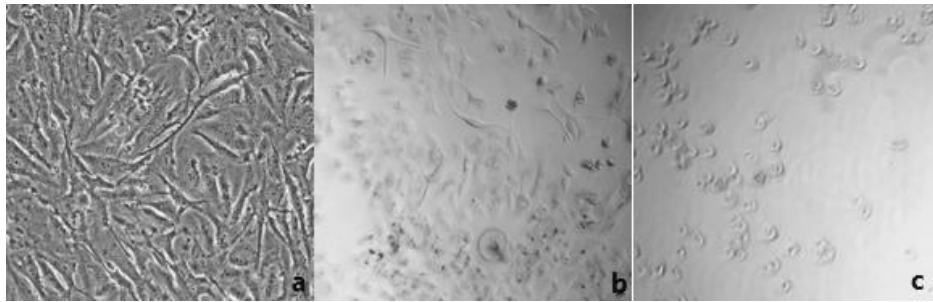


**Şekil.4.29.** NCI-H441 hücrelerinin 12 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500  $\mu$ M, c. 1500  $\mu$ M.

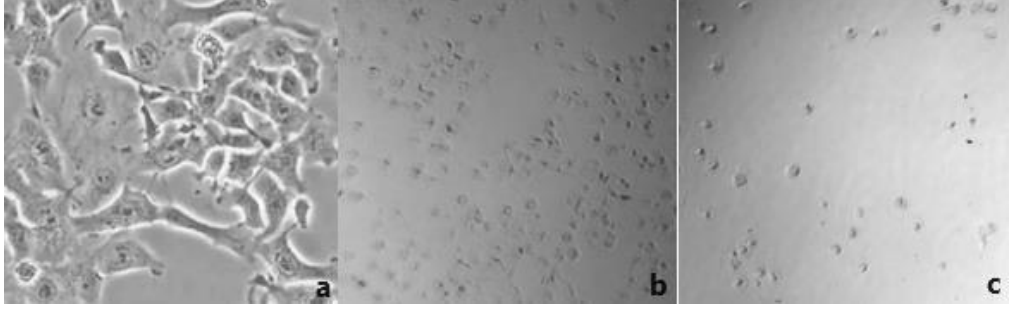


**Şekil.4.30.** HUVEC hücrelerinin 12 nm AuNP uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 500  $\mu$ M, c. 1500  $\mu$ M.

Tetrakloroaurik Asit uygulaması sonucunda, uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre doz uygulanmış hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir. HUVEC hücre hattına kıyasla NCI-H441 hücre hattında hücre proliferasyonun daha çok etkilendiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte doz uygulaması sonrasında HUVEC hücreleri küresel bir morfoloji sergilemiştir. Doz miktarı arttıkça HUVEC hücrelerinin küreselliğinin arttığı gözlemlenmiştir.

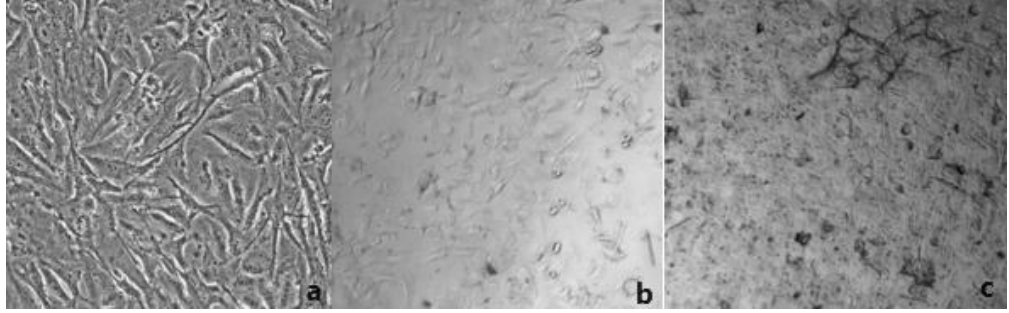


**Şekil.4.31.** NCI-H441 hücrelerinin Tetrakloroaurik Asit uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 30  $\mu$ M, c. 45  $\mu$ M.

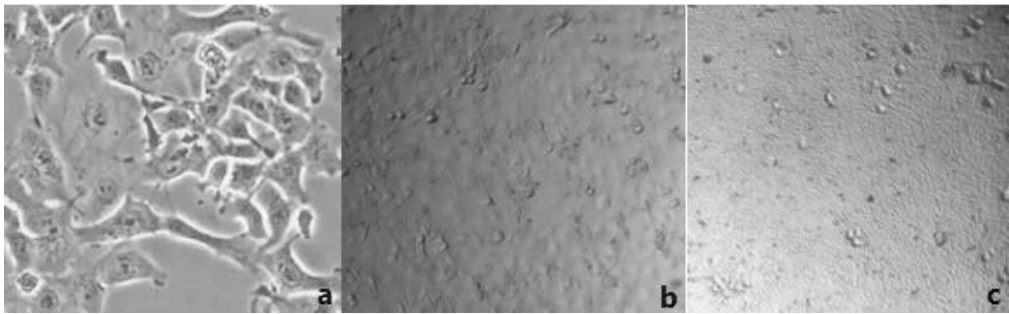


**Şekil.4.32.** HUVEC hücrelerinin Tetrakloroaurik Asit uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 30 µM, c. 45 µM.

Salep ekstraktı uygulaması sonucunda, uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre doz uygulanmış hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir. HUVEC hücre hattına kıyasla NCI-H441 hücre hattında hücre proliferasyonun daha çok etkilendiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte doz uygulaması sonrasında HUVEC hücreleri küresel bir morfoloji sergilerken NCI-H441 hücrelerinde uygulama sonucunda kristal yapı gözlemlenmiştir.

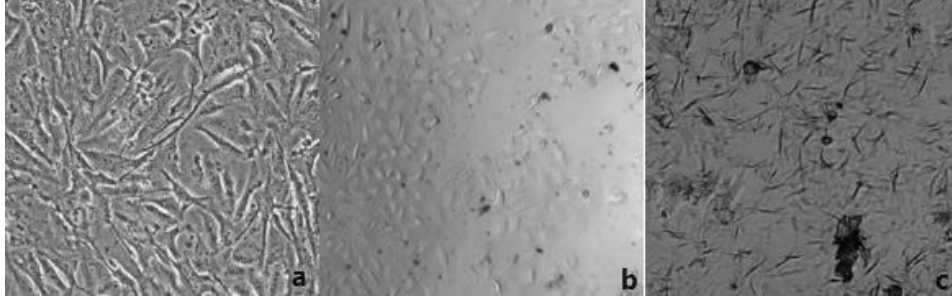


**Şekil.4.33.** NCI-H441 hücrelerinin Salep ekstraktının uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 75 µM, c. 150 µM.

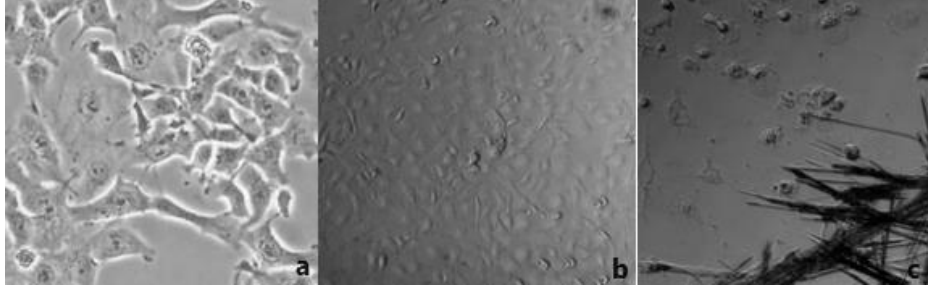


**Şekil.4.34.** HUVEC hücrelerinin Salep ekstraktının uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 75 µM, c. 150 µM.

Celecoxib uygulaması sonucunda, uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre doz uygulanmış hücre proliferasyonunda azalma gözlemlenmiştir. HUVEC hücre hattına kıyasla NCI-H441 hücre hattında hücre proliferasyonun daha çok etkilendiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte doz uygulaması sonrasında ilacın kristal yapısı gözlemlenmiştir.



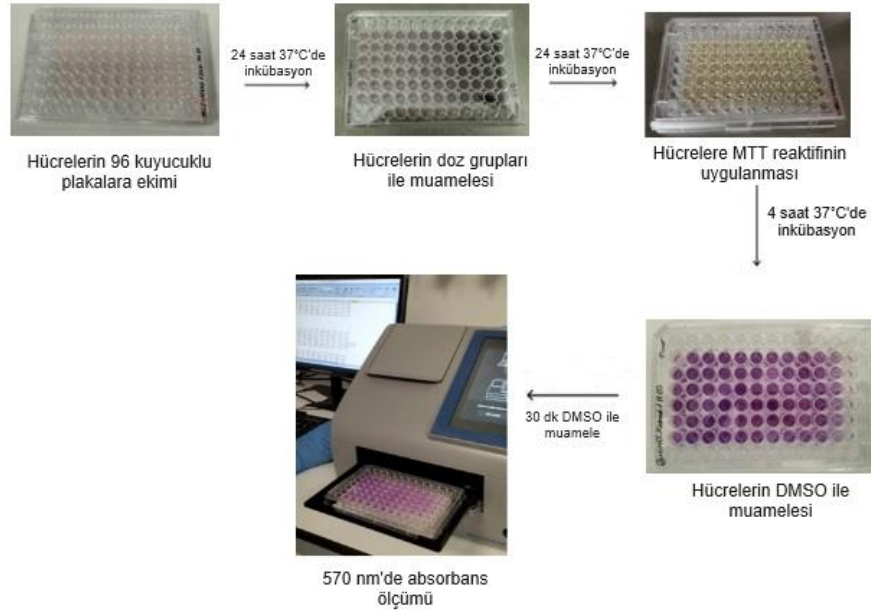
**Şekil.4.35.** NCI-H441 hücrelerinin Celecoxib uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 60 µM, c. 150 µM.



**Şekil.4.36.** HUVEC hücrelerinin Celecoxib uygulaması sonrası mikroskop görüntüsü (10X). a. Kontrol, b. 60 µM, c. 150 µM.

#### **4.4. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Yeşil Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi**

NCI-H441 hücre hattında yeşil sentezlenen AuNP'lerin boyut etkisi ve Celecoxib ilacı ile etkileşimi sonucunda hücre proliferasyonuna etkisini gözlemlemek amacıyla canlılık analizi olarak MTT yapıldı (Şekil 4.37). 570 nm dalga boyunda ölçülen absorbansların ortalamaları alındı. AuNP, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt uygulanmış hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile doz uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin ortalama absorbans değerleri oranlanarak canlılık yüzdeleri hesaplandı ve % hücre canlılık grafikleri logaritmik olarak verildi. 24 saat sonunda doz uygulanmamış kontrol hücre grubuna göre, farklı konsantrasyonlarda doz uygulanan hücrelerde canlılığın anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi.

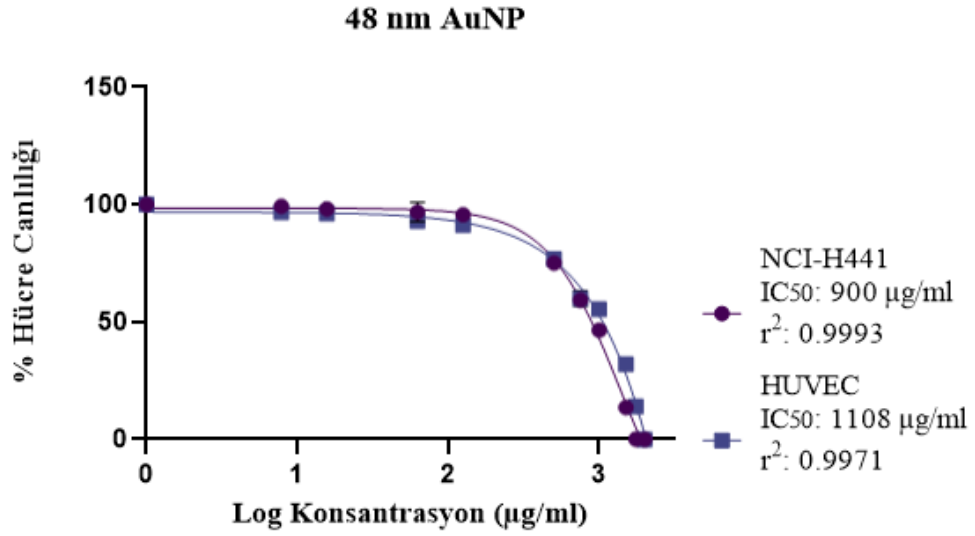


Şekil.4.37. Hücre canlılık analizinin aşamalı gösterimi

#### 4.4.1. Sentezlenen Altın Nanopartiküllerin NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattında Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

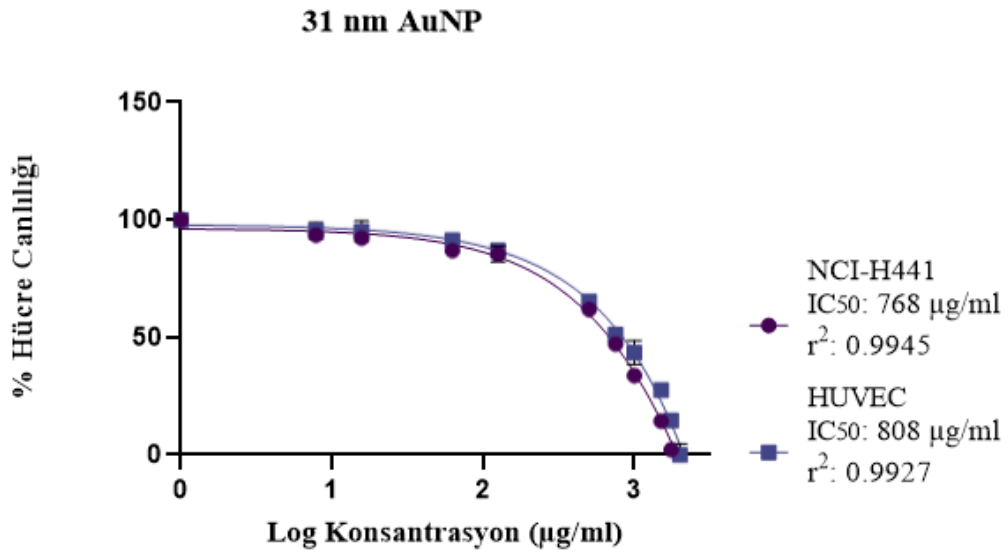
NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında  $IC_{50}$  dozunu belirlemek amacıyla yeşil sentezlenen AuNP için (15-1750  $\mu\text{g/ml}$ ) her kuyucuğa 6 tekrarlı olacak şekilde artan konsantrasyonlardaki dozlar uygulandı.

48 nm AuNP uygulamasından 24 saat sonra kontrol grubuna göre NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında hücre canlılık yüzdesinin 15  $\mu\text{g/ml}$ 'de %88,03, 62,5  $\mu\text{g/ml}$ 'de %82,99, 125  $\mu\text{g/ml}$ 'de %79,05, 250  $\mu\text{g/ml}$ 'de %73,42, 500  $\mu\text{g/ml}$ 'de %70,39, 750  $\mu\text{g/ml}$ 'de %64,14, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 'de %46,95, 1250  $\mu\text{g/ml}$ 'de %27,76, 1500  $\mu\text{g/ml}$ 'de %15,53 ve 1750  $\mu\text{g/ml}$ 'de %8,63'e düştüğü gözlemlendi. HUVEC hücre hattında ise hücre canlılık yüzdesinin 15  $\mu\text{g/ml}$ 'de %95,88, 62,5  $\mu\text{g/ml}$ 'de %88,10, 125  $\mu\text{g/ml}$ 'de %81,74, 250  $\mu\text{g/ml}$ 'de, 500  $\mu\text{g/ml}$ 'de %75,05, 750  $\mu\text{g/ml}$ 'de %62,94, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 'de %54,62, 1250  $\mu\text{g/ml}$ 'de %46,74, 1500  $\mu\text{g/ml}$ 'de %36,97 ve 1750  $\mu\text{g/ml}$ 'de %28,62'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.38). 48 nm AuNP için  $IC_{50}$  dozu GraphPad Prism 9.5.1 programı kullanılarak hesaplandı.  $IC_{50}$  dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 900  $\mu\text{M}$  ve HUVEC hücre hattında 1108  $\mu\text{M}$  olarak bulundu ( $p < 0.0001$ ).



**Şekil 4.38.** NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat 48 nm AuNP ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

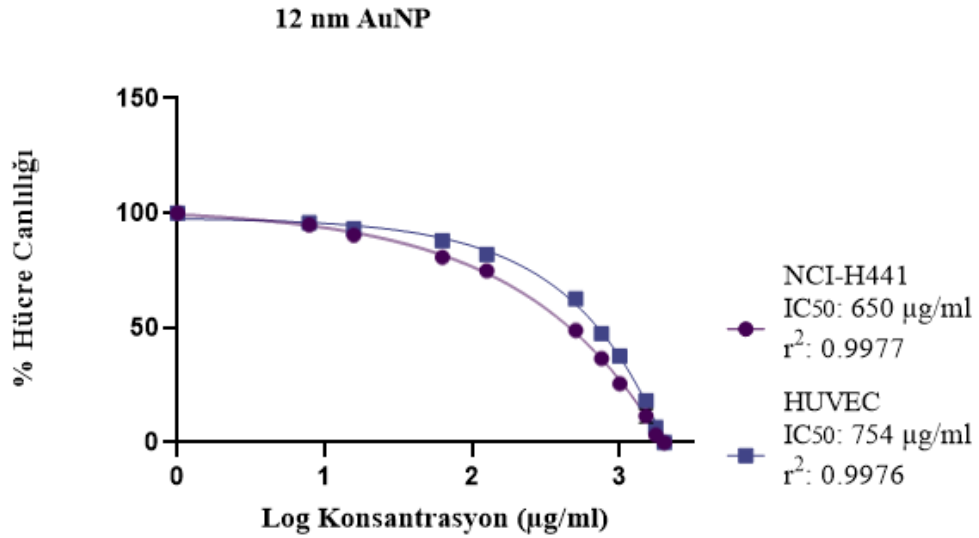
31 nm AuNP uygulamasından 24 saat sonra kontrol grubuna göre NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında hücre canlılık yüzdesinin 15 µg/ml'de %83,36, 62,5 µg/ml'de %80,37, 125 µg/ml'de %73,95, 250 µg/ml'de %71,88, 500 µg/ml'de %60,14, 750 µg/ml'de %54,40, 1000 µg/ml'de %42,81, 1250 µg/ml'de %24,73, 1500 µg/ml'de %12,93 ve 1750 µg/ml'de %8,37'e düştüğü gözlemlendi. HUVEC hücre hattında ise hücre canlılık yüzdesinin 15 µg/ml'de %86,95, 62,5 µg/ml'de %82,32, 125 µg/ml'de %77,45, 250 µg/ml'de %71,86, 500 µg/ml'de %67,46, 750 µg/ml'de %62,11, 1000 µg/ml'de %44,31, 1250 µg/ml'de %26,59, 1500 µg/ml'de %24,76 ve 1750 µg/ml'de %12,27'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.39). 31 nm AuNP için IC<sub>50</sub> dozu GraphPad Prism 9.5.1 programı kullanılarak hesaplandı. IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 768 µM ve HUVEC hücre hattında 808 µM olarak bulundu (p<0.0001).



**Şekil 4.39.** NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat 31 nm AuNP ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

12 nm AuNP uygulamasından 24 saat sonra kontrol grubuna göre NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında hücre canlılık yüzdesinin 15 µg/ml'de %83,24, 62,5 µg/ml'de %77,34, 125 µg/ml'de %68,18, 250 µg/ml'de %65, 500 µg/ml'de %56,14, 750 µg/ml'de %48,06, 1000 µg/ml'de %33,77, 1250 µg/ml'de %13,26, 1500 µg/ml'de %8,13 ve 1750 µg/ml'de %6,31'e düştüğü gözlemlendi. HUVEC hücre hattında ise hücre canlılık yüzdesinin 15 µg/ml'de %91,49, 62,5 µg/ml'de %81,95, 125 µg/ml'de %70,18, 250 µg/ml'de %65,75, 500 µg/ml'de %58,49, 750 µg/ml'de %53,12, 1000 µg/ml'de %48,69, 1250 µg/ml'de %31,88, 1500 µg/ml'de %21,74 ve 1750 µg/ml'de %15,86'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.40).

12 nm AuNP için IC<sub>50</sub> dozu GraphPad Prism 9.5.1 programı kullanılarak hesaplandı. IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 650 µM ve HUVEC hücre hattında 754 µM olarak bulundu (p<0.0001).



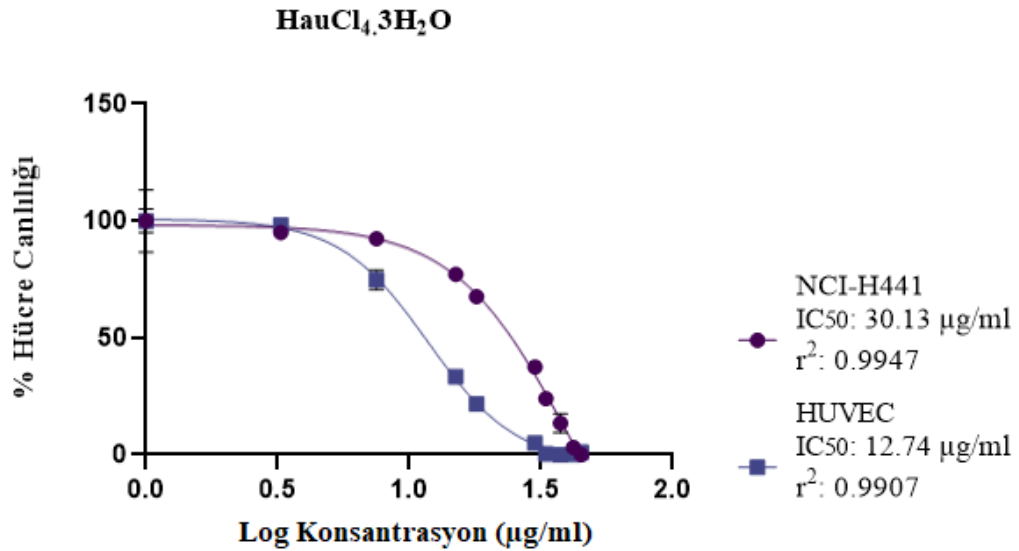
**Şekil 4.40.** NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat 12 nm AuNP ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

24 saatlik artan miktarlarda yeşil sentezlenen AuNP doz uygulamasından sonra NCI-H441 ve HUVEC hücre hatlarında hücre canlılık yüzdelerinin doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Yeşil sentezlenen AuNP, NCI-H441 kanser hücre hattına kıyasla, sağlıklı hücre hattı olan HUVEC için daha az sitotoksikite sergiledi. Bununla birlikte altın nanopartiküllerin boyutunun küçülmesine bağlı olarak sitotoksitesinin arttığı gözlemlendi.

#### 4.4.2. Tetrakloroaurik Asit ( $\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )'in NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattında Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında  $\text{IC}_{50}$  dozunu belirlemek amacıyla Tetrakloroaurik Asit için (3,25-45 µg/ml) her kuyucuğa 6 tekrarlı olacak şekilde artan konsantrasyonlardaki dozlar uygulandı. Tetrakloroaurik Asit uygulamasından 24 saat sonra kontrol grubuna göre NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında hücre canlılık yüzdesinin 3,25 µg/ml'de %93,07, 7,5 µg/ml'de %90,20, 15 µg/ml'de %87,15, 21 µg/ml'de %77,73, 24 µg/ml'de %60,36, 30 µg/ml'de %50,53, 33 µg/ml'de %28,10, 37,5 µg/ml'de %19,11, 42 µg/ml'de %9,40 ve 45 µg/ml'de %6,47'ye düştüğü gözlemlendi. HUVEC hücre hattında ise hücre canlılık yüzdesinin 3,25 µg/ml'de %72,88, 7,5 µg/ml'de %55,71, 15 µg/ml'de %38,91, 21 µg/ml'de %27,64, 24 µg/ml'de %12,12, 30 µg/ml'de %6,61, 33 µg/ml'de %5,29, 37,5 µg/ml'de %4,88, 42 µg/ml'de %3,40 ve 45 µg/ml'de %2,45'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.41).

Tetrakloroaurik Asit için IC<sub>50</sub> dozu GraphPad Prism 9.5.1 programı kullanılarak hesaplandı. IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 30.13 µM ve HUVEC hücre hattında 12.74 µM olarak bulundu (p<0.0001).



**Şekil 4.41.** NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat Tetrakloroaurik Asit ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

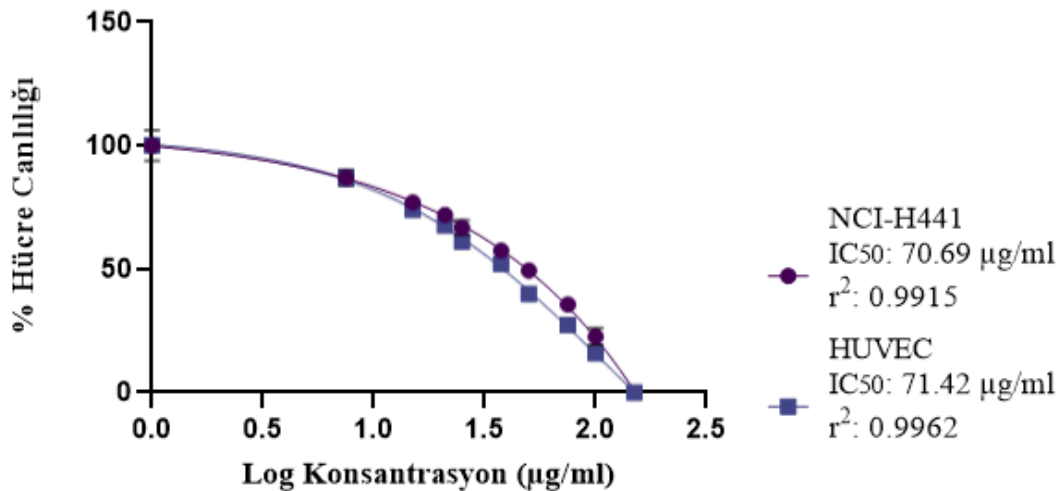
24 saatlik artan miktarlarda Tetrakloroaurik Asit doz uygulamasından sonra NCI-H441 ve HUVEC hücre hatlarında hücre canlılık yüzdelerinin doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Tetrakloroaurik Asit AuNP NCI-H441 kanser hücre hattına kıyasla, sağlıklı hücre hattı olan HUVEC için daha fazla sitotoksosite sergiledi. Yeşil sentezlenen AuNP'lere kıyasla, sentezde kullanılan ana maddelerden olan Tetrakloroaurik Asitin hem kanser hücreleri hem de sağlıklı hücreler üzerinde yüksek sitotoksositeye neden olduğu tespit edildi.

#### 4.4.3. *Orchis Spitzelii* (Salep) Ekstraktının NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattında Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında IC<sub>50</sub> dozunu belirlemek amacıyla Salep ekstraktı için (3,25-150 µg/ml) her kuyucuğa 6 tekrarlı olacak şekilde artan konsantrasyonlardaki dozlar uygulandı.

Ekstrakt uygulamasından 24 saat sonra kontrol grubuna göre NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında hücre canlılık yüzdesinin 7,5 µg/ml'de %90,20, 15 µg/ml'de %85,66, 21 µg/ml'de %78,08, 25 µg/ml'de %71,12, 37,5 µg/ml'de %67,77, 50 µg/ml'de %61,66, 75 µg/ml'de %47,26, 100 µg/ml'de %41,33 ve 150 µg/ml'de %24,16'ye düştüğü gözlemlendi. HUVEC hücre hattında ise hücre canlılık yüzdesinin yüzdesinin 7,5 µg/ml'de %94,81, 15 µg/ml'de %81,52, 21 µg/ml'de %79,86, 25 µg/ml'de %68,26, 37,5 µg/ml'de %59, 37,50 µg/ml'de %53,69, 75 µg/ml'de %43,74, 100 µg/ml'de %29,75 ve 150 µg/ml'de %13,68'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.42). Tetrakloroaurik Asit ile 24 saat inkübasyondan sonra IC<sub>50</sub> dozu GraphPad Prism 9.5.1 programı kullanılarak hesaplandı. IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 70.69 µM ve HUVEC hücre hattında 71.42 µM olarak bulundu (p<0.0001).

#### Ekstrakt (*Orchis Spitzelii*)



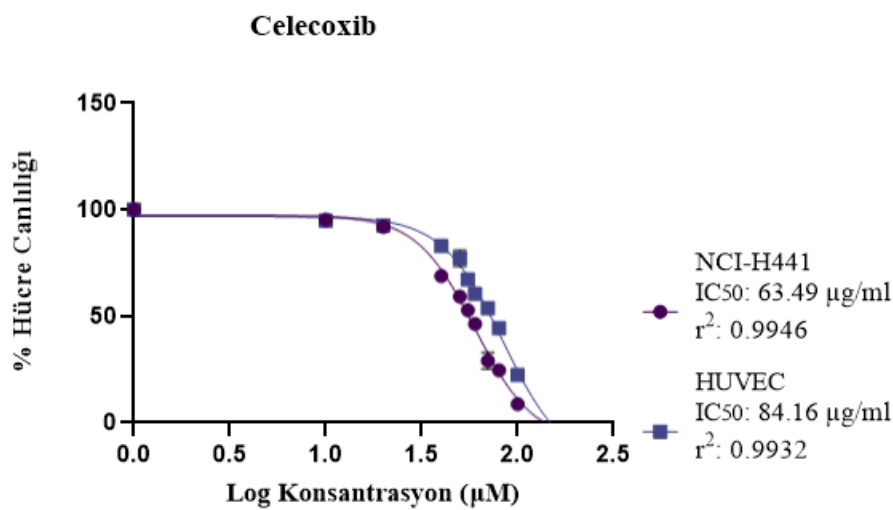
Şekil 4.42. NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat Ekstrakt (*Orchis Spitzelii*) ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

24 saatlik artan miktarlarda Salep ekstraktı doz uygulamasından sonra NCI-H441 ve HUVEC hücre hatlarında hücre canlılık yüzdelерinin doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Salep ekstraktı, NCI-H441 kanser hücre hattı ve sağlıklı hücre hattı olan HUVEC için benzer sitotoksisite sergiledi.

#### 4.4.4. Celecoxib Etken Maddesinin NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattı ve HUVEC Hücre Hattında Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında IC<sub>50</sub> dozunu belirlemek amacıyla Celecoxib için (10-150 µM) her kuyucuğa 6 tekrarlı olacak şekilde artan konsantrasyonlardaki dozlar uygulandı. Celecoxib uygulamasından 24 saat sonra kontrol grubuna göre NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında hücre canlılık yüzdesinin 10 µM'da %91,52, 20 µM'da %81,18, 40 µM'da %73,44, 50 µM'da %66,20, 55 µM'da %58,35, 60 µM'da %53,89, 70 µM'da %42,16, 80 µM'da %37,41, 100 µM'da %22,46 ve 150 µM'da %16,95'e düştüğü gözlemlendi.

HUVEC hücre hattında ise hücre canlılık yüzdesinin yüzdesinin 10 µM'da %93,13, 20 µM'da %92,46, 40 µM'da %84,30, 50 µM'da %79,87, 55 µM'da %74,34, 60 µM'da %69,42, 70 µM'da %58,89, 80 µM'da %52,81, 100 µM'da %23,33 ve 150 µM'da %17,52'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.43). Tetrakloroaurik Asit ile 24 saat inkübasyondan sonra IC<sub>50</sub> dozu GraphPad Prism 9.5.1 programı kullanılarak hesaplandı. IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 63.49 µM ve HUVEC hücre hattında 84.16 µM olarak bulundu (p<0.0001).

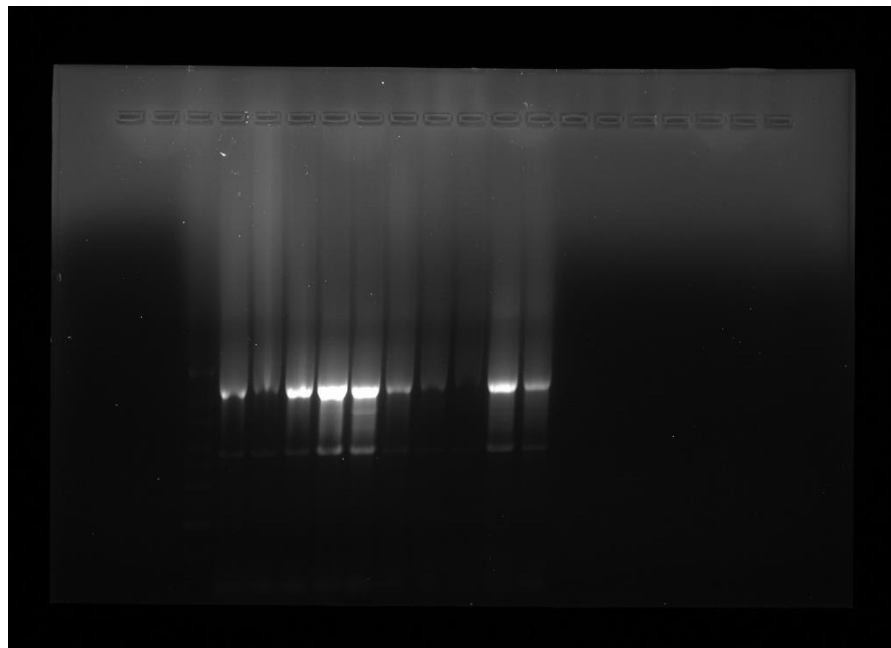


Şekil 4.43. NCI-H441 ve HUVEC hücre hattında 24 saat Celecoxib ile inkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

24 saatlik artan miktarlarda Celecoxib doz uygulamasından sonra NCI-H441 ve HUVEC hücre hatlarında hücre canlılık yüzdelerinin doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Celecoxib, NCI-H441 kanser hücre hattına kıyasla, sağlıklı hücre hattı olan HUVEC için daha az sitotoksosite sergiledi.

#### 4.5. Jel Elektroforezinde RNA Numunelerinin Tayini

NCI-H441 insan akciğer kanseri hücre hattından izole edilen RNA numuneleri sırasıyla soldan sağa doğru RNA ladder, kontrol, 48 nm AuNP, 31 nm AuNP, 12 nm AuNP, Salep ekstraktı, Celecoxib, 48 nm AuNP/ Celecoxib, 31 nm AuNP/ Celecoxib, 12 nm AuNP/ Celecoxib ve Ekstrakt/ Celecoxib RNA numuneleri jele yüklendi ve yürütülerek bant profili incelendi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.44. RNA örneklerinin bant profili

#### 4.6. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib ve Ekstrakt Uygulamasının Gen Ekspresyonlarına Etkisinin İncelenmesi

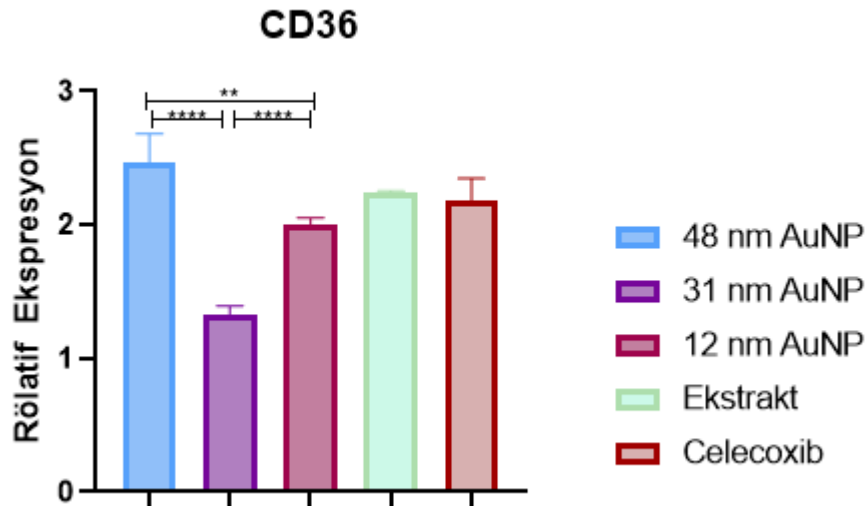
NCI-H441 hücre hattına belirlenen  $IC_{50}$  değeri olan 900  $\mu\text{g/ml}$  48 nm AuNP, 750  $\mu\text{g/ml}$  31 nm AuNP, 650  $\mu\text{g/ml}$  12 nm AuNP, 70  $\mu\text{g/ml}$  Ekstrakt ve 60  $\mu\text{M}$  Celecoxib dozu ve kombine halleri uygulandı ve 24 saat 37°C, %5  $\text{CO}_2$  ortamı etüvde inkübe edildi. Süre sonunda izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'larla qRT-PCR'da doz uygulaması sonucu hedef genler olan CD36, PPAR- $\gamma$ , TIMP2, MMP2, PGE2, COX-2 ve VEGFR2 gen ekspresyonlarına bakıldı.

qRT-PCR sonuçlarından elde edilen Ct değerlerine göre NCI-H441 hücre hattında kontrol grubu ve doz uygulaması yapılan gruplar için hedef genlerin  $\beta$ - Actin housekeeping geni ile normalizasyonu ile  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplandı.

Kontrol grubu ile doz muamelesi yapılmış gruplar arasında hedef gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde gruplar arası farklılık varyans (ANOVA) analizi kullanıldı. p değeri  $<0.05$  ise anlamlı bir farklılık olduğu kabul edildi (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ).

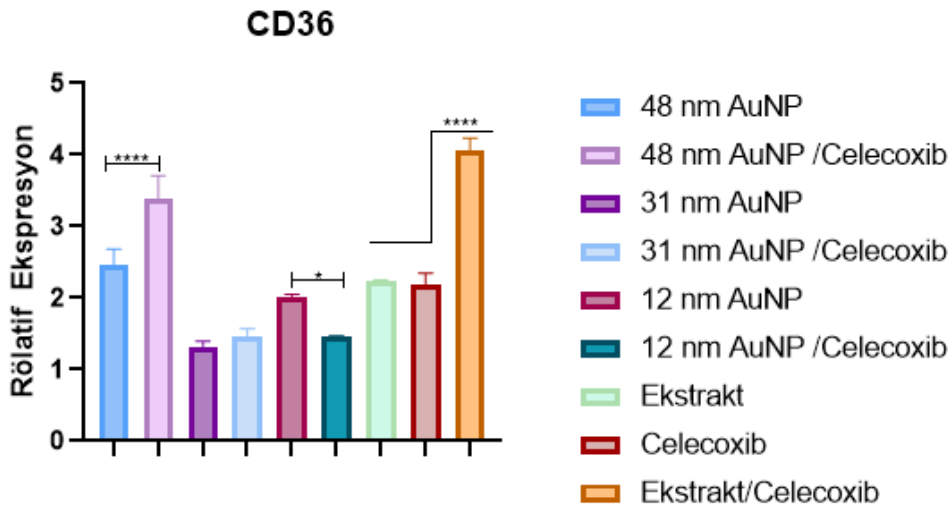
#### 4.6.1. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib ve Ekstrakt Uygulamasının CD36 Gen Ekspresyonuna Etkisi

NCI-H441 hücre hattında CD36 gen ekspresyonunda 48 nm AuNP ( $p<0.0001$ ), 31 nm AuNP ( $p<0.0001$ ) ve 12 nm AuNP ( $p=0.0094$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken ve Ekstrakt ( $p=0.3037$ ) ve Celecoxib ( $p=0.2173$ ) uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Ayrıca AuNP'ler, Ekstrakt ve Celecoxib uygulamaları ile kıyaslandığında CD36 gen ekspresyonunu benzer şekilde upregüle ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte diğer AuNP'lerle kıyaslandığında 48 nm AuNP'nin gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla upregüle etmesinin şekil çeşitliliğinden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.45. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu CD36 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

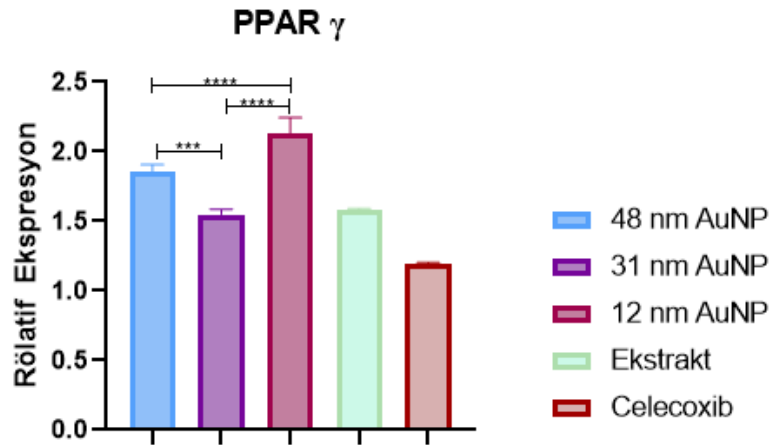
NCI-H441 hücre hattında CD36 gen ekspresyonunda 48 nm AuNP/Celecoxib ( $p<0.0001$ ), 12 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.0122$ ) ve Ekstrakt/Celecoxib ( $p<0.0001$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken 31 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.9673$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ekstrakt ve Celecoxib ajanının kombine tedavisinin sinerjik etki göstererek gen ekspresyon seviyesini iyi seviyede upregüle ettiği gözlemlenmiştir. Hedef gen olan CD36 için kontrole göre ve gruplar arasında anlamlı bir upregülasyon tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ).



Şekil 4.46. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu CD36 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

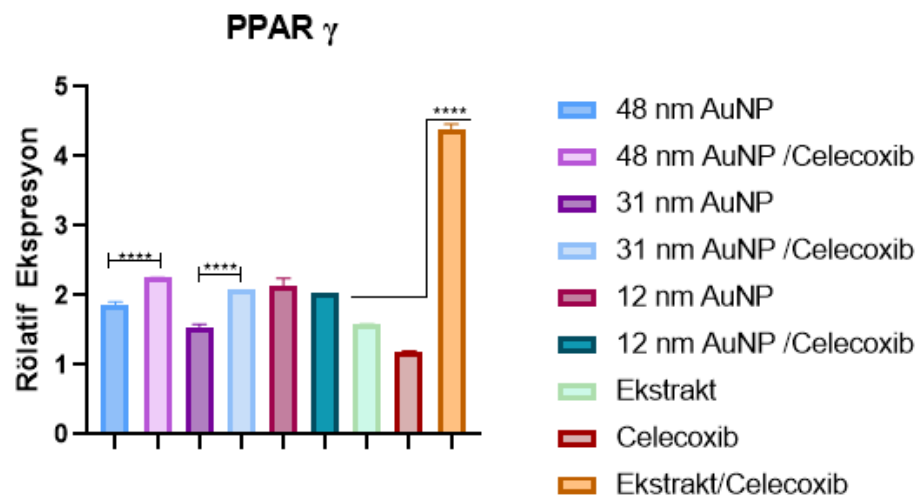
#### 4.6.2. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib ve Ekstrakt Uygulamasının PPAR $\gamma$ Gen Ekspresyonuna Etkisi

NCI-H441 hücre hattında PPAR $\gamma$  gen ekspresyonunda 48 nm AuNP ( $p<0.0001$ ), 31 nm AuNP ( $p=0.0007$ ), 12 nm AuNP ( $p=0.0013$ ), Ekstrakt ( $p<0.0001$ ) ve Celecoxib ( $p<0.0001$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca AuNP'ler, ekstrakt uygulamaları ile kıyaslandığında PPAR $\gamma$  gen ekspresyonunu benzer şekilde upregüle ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte diğer AuNP'lerle kıyaslandığında 12 nm AuNP'nin gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla upregüle etmesi, daha küçük boyutlu olmasıyla alakalıdır. NP boyutu küçüldükçe sitotoksik etki artmaktadır.



**Şekil 4.47.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu PPAR $\gamma$  gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

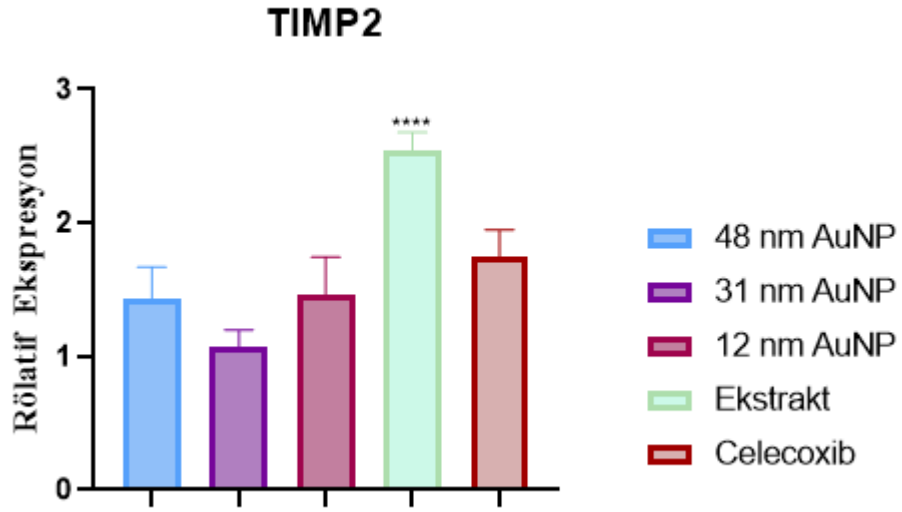
NCI-H441 hücre hattında PPAR $\gamma$  gen ekspresyonunda 48 nm AuNP/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ), 31 nm AuNP/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) 12 nm AuNP/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) ve Ekstrakt/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Daha küresel şekillere sahip olan 31 nm AuNP'ün Celecoxib ile iyi bir sinerjistik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Ekstrakt ve Celecoxib ajanının kombine tedavisinin sinerjik etki göstererek gen ekspresyon seviyesini iyi seviyede upregüle ettiği gözlemlenmiştir. Hedef gen olan PPAR $\gamma$  için kontrole göre ve gruplar arasında anlamlı bir upregülasyon tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ).



**Şekil 4.48.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu PPAR $\gamma$  gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

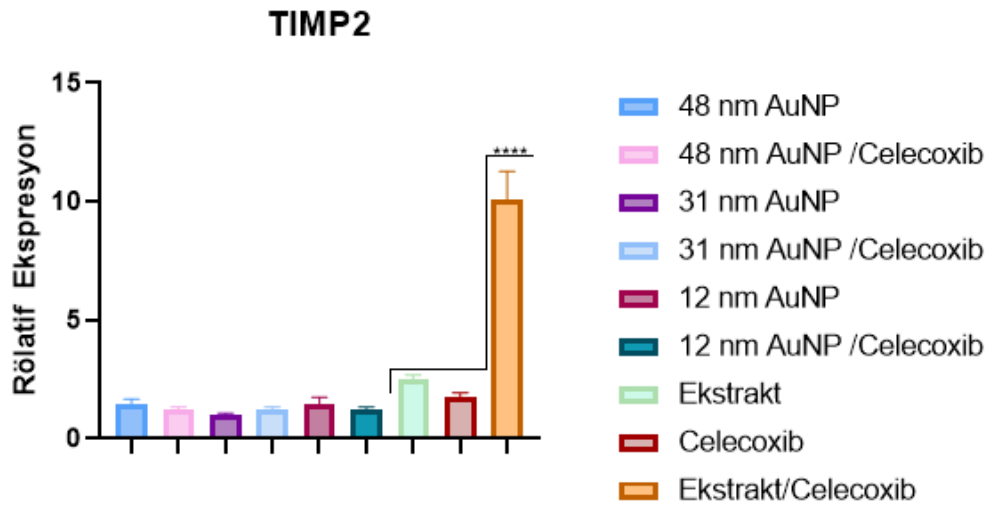
#### 4.6.3. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib ve Ekstrakt Uygulamasının TIMP2 Gen Ekspresyonuna Etkisi

NCI-H441 hücre hattında TIMP2 gen ekspresyonunda Ekstrakt ( $p=0.0073$ ) ve uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken 48 nm AuNP ( $p=0.9481$ ), 31 nm AuNP ( $p>0.9999$ ), 12 nm AuNP ( $p=0.9280$ ) ve Celecoxib ( $p=0.4928$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca ekstrakt uygulamasının TIMP2 gen ekspresyonunu daha etkin şekilde upregüle ettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.49. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu TIMP2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

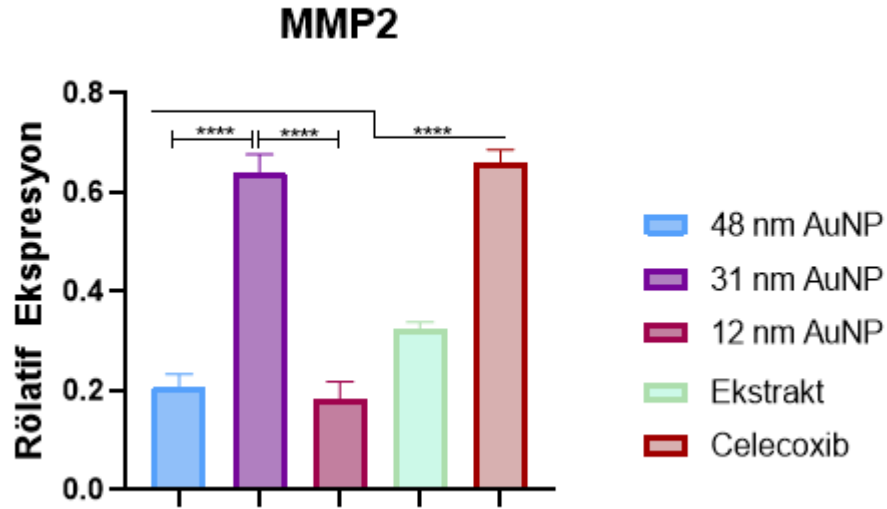
NCI-H441 hücre hattında TIMP2 gen ekspresyonunda Ekstrakt/Celecoxib ( $p<0.0001$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken, 48 nm AuNP/Celecoxib ( $p>0.9999$ ), 31 nm AuNP/Celecoxib ( $p>0.9999$ ) ve 12 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.9988$ ) uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Ekstrakt ve Celecoxib ajanının kombine tedavisinin sinerjik etki göstererek gen ekspresyon seviyesini etkin bir şekilde upregüle ettiği gözlemlenmiştir. Hedef gen olan TIMP2 için kontrole göre ve gruplar arasında anlamlı bir upregülasyon tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ).



**Şekil 4.50.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu TIMP2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

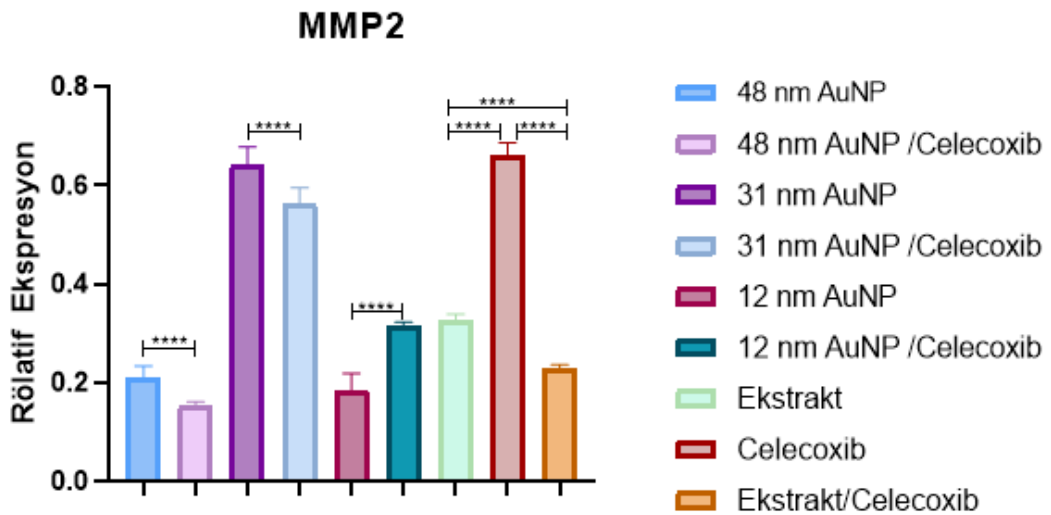
#### 4.6.4. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib ve Ekstrakt Uygulamasının MMP2 Gen Ekspresyonuna Etkisi

NCI-H441 hücre hattında MMP2 gen ekspresyonunda 48 nm AuNP ( $p < 0.0001$ ), 31 nm AuNP ( $p < 0.0001$ ), ekstrakt ( $p < 0.0001$ ) ve Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken 12 nm AuNP ( $p = 0.0639$ ) ve uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Ayrıca 48 nm AuNP ve 12 nm AuNP, Ekstrakt ve Celecoxib uygulamaları ile kıyaslandığında AuNP uygulamasının MMP2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte 12 nm AuNP'nin daha küçük boyuta sahip olması ile sitotoksitesi artarken ve 48 nm AuNP'nin şekil çeşitliliğinden dolayı gen ekspresyonunu benzer şekilde downregüle etmektedir.



Şekil 4.51. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu MMP2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

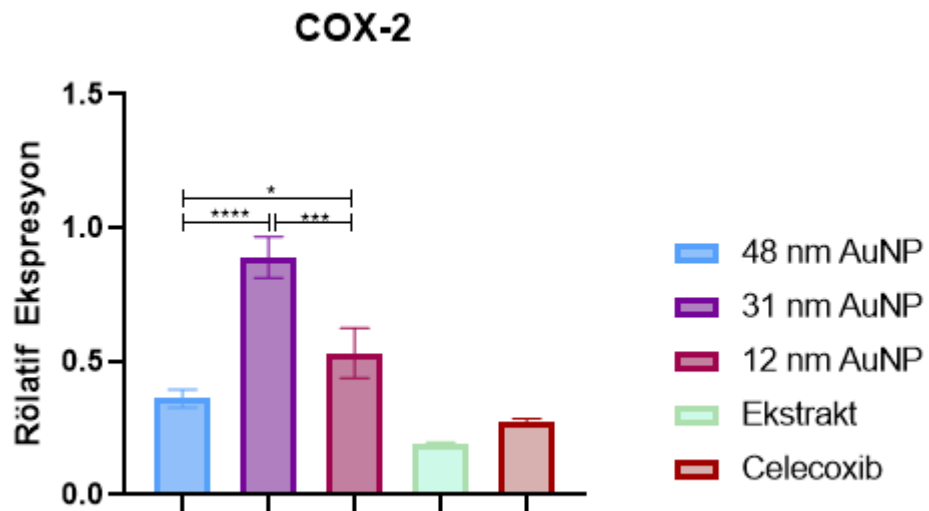
NCI-H441 hücre hattında MMP2 gen ekspresyonunda 31 nm AuNP/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) ve 12 nm AuNP/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken 48 nm AuNP/Celecoxib ( $p = 0.0550$ ) ve Ekstrakt/Celecoxib ( $p = 0.09202$ ) uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Daha küresel şekillere sahip olan 31 nm AuNP'ün Celecoxib ile iyi sinerjistik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Hedef gen olan MMP2 için kontrole göre ve gruplar arasında anlamlı bir downregülasyon tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ).



Şekil 4.52. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu MMP2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

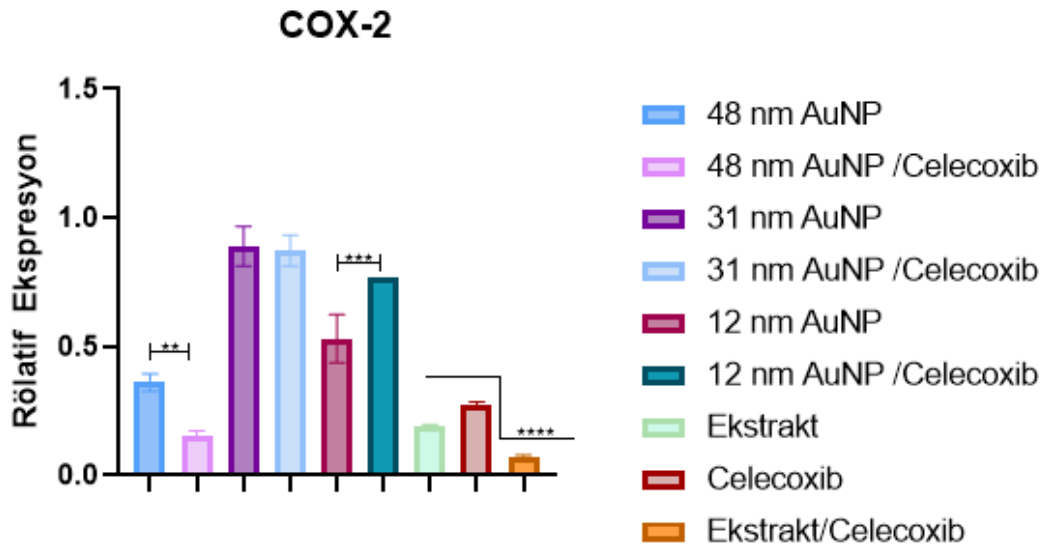
#### 4.6.5. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib, Tetrakloroaurik Asit ve Ekstrakt Uygulamasının COX-2 Gen Ekspresyonuna Etkisi

NCI-H441 hücre hattında COX-2 gen ekspresyonunda 48 nm AuNP ( $p<0.0001$ ), 31 nm AuNP ( $p<0.0001$ ), 12 nm AuNP ( $p=0.0078$ ), Ekstrakt ( $p=0.0089$ ) ve Celecoxib ( $p=0.0013$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 48 nm AuNP ve 12 nm AuNP, Ekstrakt ve Celecoxib uygulamaları ile kıyaslandığında AuNP uygulamasının COX-2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte Ekstrakt uygulaması ile Celecoxib uygulaması kıyaslandığında Ekstrakt uygulamasının COX-2 inhibitörü olan Celecoxibe göre COX-2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle ettiği tespit edilmiştir. Ek olarak 12 nm AuNP kıyaslandığında 48 nm AuNP'nin gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle etmesinin şekil çeşitliliğinden olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 4.53.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu COX-2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

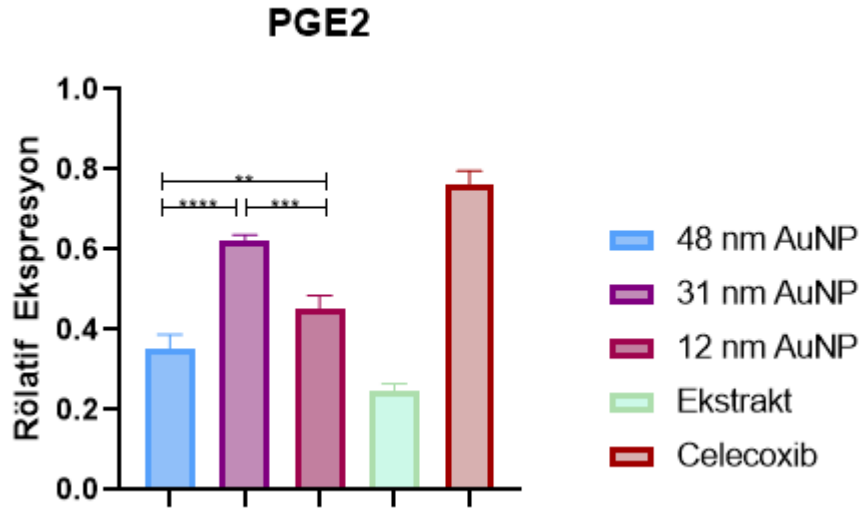
NCI-H441 hücre hattında COX-2 gen ekspresyonunda 48 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.0013$ ), 31 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.0999$ ), 12 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.0002$ ) ve Ekstrakt/Celecoxib ( $p=0.0013$ ) uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Hedef gen olan COX-2 için kontrole göre ve gruplar arasında anlamlı bir downregülasyon tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ).



**Şekil 4.54.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu COX-2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

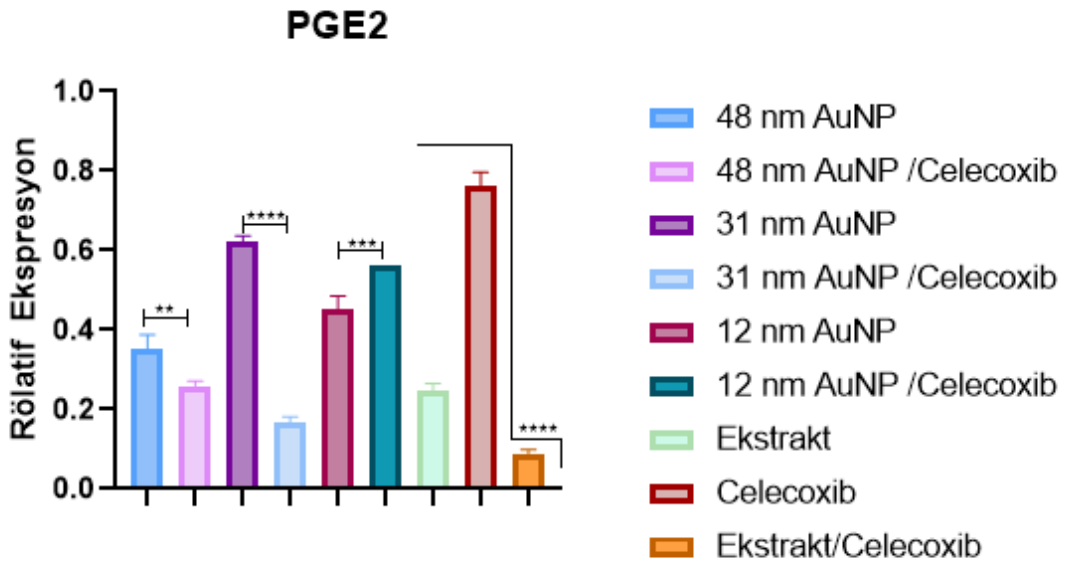
#### 4.6.6. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Ekstrakt ve Celecoxib Uygulamasının PGE2 Gen Ekspresyonuna Etkisi

NCI-H441 hücre hattında PGE2 gen ekspresyonunda 48 nm AuNP ( $p < 0.0001$ ), 31 nm AuNP ( $p < 0.0001$ ), 12 nm AuNP ( $p < 0.0001$ ) Ekstrakt ( $p < 0.0001$ ) ve Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 48 nm AuNP ve 12 nm AuNP uygulamaları, Celecoxib uygulaması ile kıyaslandığında AuNP uygulamasının PGE2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte Ekstrakt uygulaması ile Celecoxib uygulaması kıyaslandığında Ekstrakt uygulamasının COX-2 inhibitörü olan Celecoxibe göre PGE2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle ettiği tespit edilmiştir. Ek olarak 12 nm AuNP kıyaslandığında 48 nm AuNP'ün gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle etmesinin şekil çeşitliliğinden olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 4.55.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu PGE2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

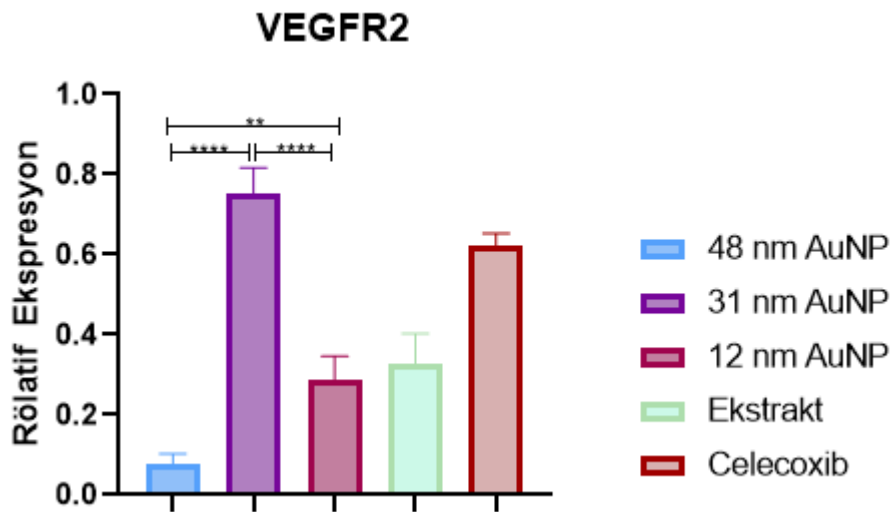
NCI-H441 hücre hattında PGE2 gen ekspresyonunda 48 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.0021$ ), 31 nm AuNP/Celecoxib ( $p<0.0001$ ) ve Ekstrakt/Celecoxib ( $p=0.0013$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken, 12 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.0002$ ) uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Hedef gen olan PGE2 için kontrole göre ve gruplar arasında anlamlı bir downregülasyon tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ).



**Şekil 4.56.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu PGE2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

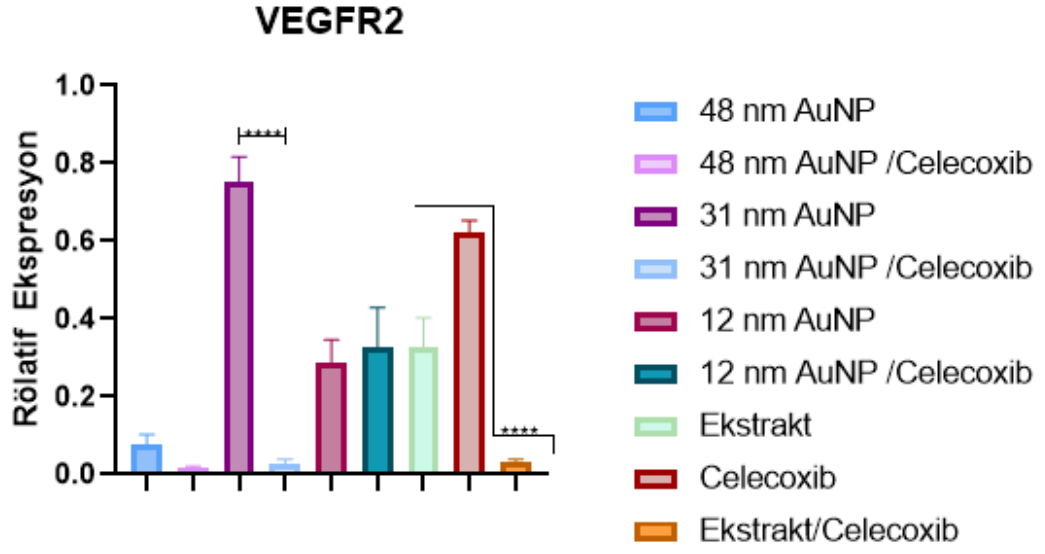
#### 4.6.7. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Ekstrakt ve Celecoxib Uygulamasının VEGFR2 Gen Ekspresyonuna Etkisi

NCI-H441 hücre hattında VEGFR2 gen ekspresyonunda 48 nm AuNP ( $p<0.0001$ ), 31 nm AuNP ( $p<0.0001$ ), 12 nm AuNP ( $p=0.0062$ ) Ekstrakt ( $p=0.0005$ ) ve Celecoxib ( $p<0.0001$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 48 nm AuNP ve 12 nm AuNP uygulamaları, Celecoxib uygulaması ile kıyaslandığında AuNP uygulamasının VEGFR2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte Ekstrakt uygulaması ile Celecoxib uygulaması kıyaslandığında 48 nm AuNP ve 12 nm AuNP'ün VEGFR2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle ettiği tespit edilmiştir. Ek olarak 12 nm AuNP kıyaslandığında 48 nm AuNP'nin gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle etmesinin şekil çeşitliliğinden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.57. NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu VEGFR2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

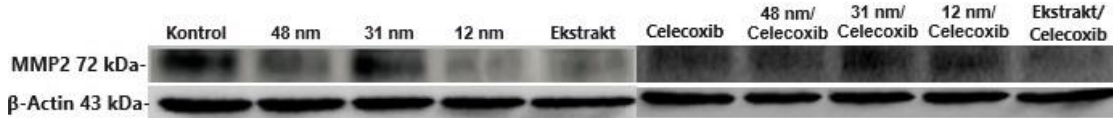
NCI-H441 hücre hattında VEGFR2 gen ekspresyonunda 31 nm AuNP/Celecoxib ( $p<0.0001$ ) ve Ekstrakt/Celecoxib ( $p=0.0013$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken, 48 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.0021$ ) ve 12 nm AuNP/Celecoxib ( $p=0.0002$ ) ve uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Hedef gen olan VEGFR2 için kontrole göre ve gruplar arasında anlamlı bir downregülasyon tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ).



**Şekil 4.58.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik kombine doz uygulaması sonucu VEGFR2 gen ekspresyonunun kontrol grubu ve gruplar arası değişiminin qRT-PCR ile gösterimi

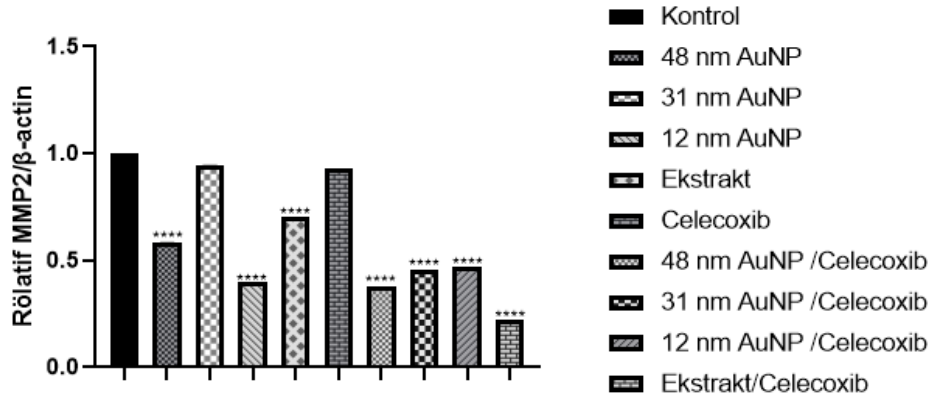
#### 4.7. NCI-H441 Akciğer Kanseri Hücre Hattında Sentezlenen Altın Nanopartiküller, Celecoxib ve Ekstrakt Uygulamasının Protein Düzeyine Etkileri

NCI-H441 hücre hattına belirlenen  $IC_{50}$  değeri olan 900  $\mu\text{g/ml}$  48 nm AuNP, 750  $\mu\text{g/ml}$  31 nm AuNP, 650  $\mu\text{g/ml}$  12 nm AuNP, 70  $\mu\text{g/ml}$  Ekstrakt ve 60  $\mu\text{M}$  Celecoxib dozu ve kombine halleri uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda Ripa Lysis Buffer ve proteaz inhibitör kokteyl kullanılarak hücre lizatları hazırlandı. Hücre lizatlarında protein miktar tayini yapıldı ve western blot analizi aşamaları gerçekleştirildi. MMP2 protein bant yoğunlukları ECL Substrat ile görüntülendi ve hedef proteinlerle birlikte normalizasyon işlemleri için  $\beta$ -Actin proteinin tespiti yapıldı. Image Lab programı kullanılarak MMP2 bant yoğunlukları, housekeeping  $\beta$ -actin bant yoğunlukları ile normalize edildi ve GraphPad Prism 9.5.1 programında istatistiksel analizleri yapıldı. MMP2 için kontrole göre ve gruplar arasında anlamlı bir downregülasyon tespit edilmiştir (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



Şekil 4.59. NCI-H441 hücre hattında Western analizi sonucu protein seviyelerinin değişimi

NCI-H441 hücre hattında MMP2 protein düzeyinde 48 nm AuNP ( $p < 0.0001$ ), 31 nm AuNP ( $p < 0.0001$ ), 12 nm AuNP ( $p < 0.0001$ ), Ekstrakt ( $p < 0.0001$ ), Celecoxib ( $p < 0.0001$ ), 48 nm AuNP/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ), 31 nm AuNP/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ), 12 nm AuNP/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) ve Ekstrakt/Celecoxib ( $p < 0.0001$ ) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte 12 nm AuNP'nin daha küçük boyuta sahip olması ile sitotoksitesi artarken ve 48 nm AuNP'nin şekil çeşitliliğinden dolayı protein düzeyini benzer şekilde baskıladığı düşünülmektedir. Celecoxib ile kombine verilen NP'ler arasında en iyi sonucu daha küresel formda olan 31 nm AuNP vermiştir. Diğer AuNP'lerin Celecoxib ile kombine halleri protein düzeyi seviyelerinde etkin bir sonuç vermemiştir. Ek olarak Ekstrakt ve Celecoxib ilacının kombine tedavisi kanserin ilerlemesini inhibe etmek için potansiyel bir terapötik hedef olarak umut vaat etmektedir.



**Şekil 4.60.** NCI-H441 hücre hattında 24 saatlik doz uygulama sonucu MMP2 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre değişiminin gösterimi

NCI-H441 hücrelerinin AuNP ile uyarılması, MMP2'nin salgılanmasını önemli ölçüde inhibe etmiştir. Bu sonuçlar, PPAR-y aktivasyonunun, MMP2 salgılanmasının inhibisyonunu içeren, NCI-H441 hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu azalttığını göstermektedir. Tsung ve arkadaşları, MMP-2'nin downregülasyonu sonucunda tümör büyümesinin azaldığı ve akciğer nodüllerinin oluşumunu engellediğini göstermiştir (Tsung ve diğerleri, 2008).

#### 4.8. TARTIŞMA

Akciğer kanseri dünya çapında majör kanser insidansına neden olmakla birlikte meme, prostat ve kolon kanserinin toplamından daha fazla ölüme neden olmaktadır. Akciğer kanserinin en yaygın alt tipi olan Adenokarsinoma, vakaların %40'ından fazlasını oluşturmakta ve göreceli sıklığı her geçen gün artmaktadır (Boyle ve Levin, 2008; Lortet-Tieulent ve diğerleri, 2014; Travis ve diğerleri, 2011). Bu hastalığın patogenezinin anlaşılmasındaki başarılarla ve tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine rağmen ne yazık ki akciğer adenokarsinoması hala en agresif ve genel sağkalımı 5 yıldan kısa olan tümör türlerinden biridir. Akciğer adenokarsinomu sıklıkla yayılmış metastatik tümörleri içeren ileri evrelerde teşhis edilmektedir. Bununla birlikte geleneksel radyoterapilere ve kemoterapilere karşı yüksek direnç, tedavinin etkinliği açısından büyük bir zorluk teşkil etmektedir (Denisenko, Budkevich ve Zhivotovsky, 2018). Bu nedenle özellikle kanserin ilerlemesiyle ilgili altta yatan moleküler mekanizmaların araştırılması ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımların başarılı bir şekilde geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser ilerlemesini engellemek ve etkili bir tedavi uygulamak amacıyla nanopartikül kullanımı terapötik bir strateji olarak düşünülmektedir.

Altın nanopartiküller, antikanser tedavisini kolaylaştırma potansiyelleri nedeniyle bir süredir araştırılmaktadır. AuNP'lerin sentezindeki çeşitlilik ve uyaranlara duyarlı olmaları, onları umut verici çok işlevli nanoplatformlar haline getirmektedir (Tian ve diğerleri, 2016). Bitki ekstraktları, bitki biyomolekülleri, bakteriler, mantarlar veya bunların lizatları gibi biyolojik malzemelerin uygulanmasını içeren, daha güvenli üretim alternatiflerine imkân sağlayan yeşil sentez, metal nanopartiküller üretmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Boroumand Moghaddam ve diğerleri, 2015; Mittal, Chisti ve Banerjee, 2013). Bitki özütü, NP'lerin biyogenezi için hem indirgeyici hem de stabilize edici ajanlar olarak görev yapan çeşitli ikincil metabolitler içermektedir. Farklı bitki kısımlarından gelen metabolit içeriği seviyesindeki farklılıklar NP'lerin morfolojisinin şekillenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Ahmed, Annu, ve diğerleri, 2016). Metal nanopartiküllerin bitki aracılı sentezi, hızlı, iyi tekrarlanabilir, ekolojik, çevre dostu, ucuz ve endüstriyel ölçekte de kolaylıkla uygulanabilen prosedürü nedeniyle kimyasal ve fiziksel yöntemlere göre çok sayıda fayda sağlamaktadır (Kozma, Rónavári, Kónya ve Kukovecz, 2016; Narayanan ve Sakthivel, 2011).

Ayrıca yeşil tekniklerle sentezlenen AuNP'ler, kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar gibi bağışıklık sistemiyle ilişkili hastalıklara karşı tedavide mükemmel bağışıklık tepkisi düzenlemesi ve etkinliği sergilemektedir (Cai ve diğerleri, 2022). Ancak şifalı bitkilerin antikanser özelliklerine ilişkin bilimsel araştırmalar sınırlıdır. Biyomedikal etkileri tetikleyen bitki ekstraktlarının kesin mekanizması ve temel bileşenleri yeterince araştırılmamıştır (Santhosh, Genova ve Chamati, 2022). Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Curcumae Kwangsiensis Folium*'un sulu yaprak ekstraktından yeşil sentezlenen AuNP'lerin (~8–25 nm), antioksidan özelliklerinden dolayı insan yumurtalık kanserinde mükemmel ve doza bağımlı bir şekilde antikanser potansiyeli sergilediği gözlemlenmiştir (Jingqin Chen ve diğerleri, 2021).

Salep (*Orchis Spitzelii*) bitkisi, azotlu maddeler, nişasta, proteinler, şekerler, hidroksibenzaldehitler, ferulik asit, kuersetin, daukosterol, sirsilineol, steroidler ve glikomannan gibi güçlü antioksidan özelliklere sahip olan bileşikler içermektedir (Jahromi ve diğerleri, 2016; Lumaga ve diğerleri, 2006). Bununla birlikte geleneksel tıpta salep, göğüs ağrısı, göğüs ve bağırsak bozuklukları, tüberküloz, ishal, parkinson hastalığı ve kanserin tedavisinde reçete edilmektedir (Farhoosh ve Riazi, 2007; Kaya ve Tekin, 2001). Chen ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada salep içeriğinde bulunan bir fitokimyasal olan Moscatilin'in, bazı insan kanser hücrelerinde JNK aktivasyonu aracılı apoptoz sinyallemesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Ayrıca moskatilin, DNA hasarını, H2AX ve p53'ün fosforilasyonunu ve p21'in upregülasyonunu indüklemektedir (T.-H. Chen ve diğerleri, 2008).

Literatürden yola çıkılarak antikanser etkisi bilinen Salep bitkisinin, içeriğinde birçok fitokimyasal barındırması nedeniyle AuNP sentezi için iyi bir indirgeyici olarak kullanılabilirliği düşünülmüştür. Çalışmamızın ilk aşamasında, altın nanopartiküllerin Salep bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenebileceği ve sentezdeki parametrelerin nanopartiküllerin karakteristik özelliklerini ve aktivitelerini değiştirebileceği tespit edilmiştir. Altın sulu çözeltisinin konsantrasyonu düşükçe sentez hızının arttığı ve sentez süresinin düştüğü gözlemlenmiştir. Sentez aşamasında kullanılan Tetrakloroaurik asit ( $\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) sulu çözeltisi sarı renkli, Salep sulu bitki ekstraktı ise renksizdi. Tetrakloroaurik asit çözeltisine Salep sulu ekstraktının eklenmesi ve manyetik karıştırıcı üzerinde 90 °C'de ısıtma işlemini takiben literatürde de belirtildiği gibi yakut kırmızısına doğru renk değişimi gözlemlenmiştir (Al-Radadi ve Journal, 2023).

Elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu çeşitli analitik tekniklerle gerçekleştirilmiştir. UV-Vis spektroskopisi ile AuNP'lerin 546 nm'de karakteristik pik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da literatürdeki bilgiler doğrultusunda AuNP oluşumunu doğrulamaktadır. Philip ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Hibiscus rosa sinensis* ile yeşil sentezlenen AuNP için 548 nm'de oldukça keskin bir SPR bandı gözlemlenmiştir. Bu dalga boylarında gözlemlenen keskin pikler küresel nanopartiküllerin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Philip, 2010). Bununla birlikte, nanopartiküllerin FTIR ile karakterizasyonun da özellikle Salep yapısında bulunan grupların altının indirgenmesinde rolü olduğu ortaya çıkarılmıştır. Salep ekstraktında gözlemlenen 3318.78 cm<sup>-1</sup>'deki güçlü ve geniş bant, polisakkarit substratındaki -OH ve -COOH gruplarının gerilmesinden kaynaklanmaktadır. 1635 cm<sup>-1</sup> civarındaki bant, glikomannan omurgasındaki C=O grubunun gerilmesine atfedilmektedir. Bu karakteristik zirvelerin tümü, AuNP'lerde daha yüksek dalga boylarına doğru hafif bir kayma göstermiştir. Bu kayma, altın nanoparçacıkları ile ekstrakt arasında mevcut olan elektron açısından zengin gruplar (C=O ve OH gibi) arasındaki koordinasyon bağlarının oluşumuna atfedilebilmektedir (Bardajee ve diğerleri, 2012; Pourjavadi ve diğerleri, 2012). Chen ve arkadaşları, *Curcumae Kwangsiensis* Folium sulu ekstraktı ile yeşil sentezlenen altın nanopartikülün, FTIR analizinde gözlemlenen karakteristik titreşim bantlarının bir kez daha *Curcumae Kwangsiensis* Folium işlevselleştirilmiş AuNP'yi temsil ettiğini bildirmiştir. Alkolik ve fenolik hidroksil grupları (O-H gerilme titreşimi), 3342 cm<sup>-1</sup> dalga sayısında net bir bantla gözlemlenmiştir. 2857 cm<sup>-1</sup>'deki net bant asimetric CH<sub>2</sub> gerilmesine atfedilmektedir. 1400–1600 cm<sup>-1</sup>'deki bantlar aromatik halkaları göstermektedir. Bu nedenle aromatik halka ve OH ataması, Au yüzeyi ile polifenolik bağlanmaya işaret etmektedir. 1049 cm<sup>-1</sup>'deki güçlü bant C-O gerilmesi (Metoksil grupları) ile ilgilidir. Ayrıca 569 cm<sup>-1</sup>'deki karakteristik bant Au-O'ya atfedilmiştir (Jingqin Chen ve diğerleri, 2021).

Yapılan XRD analizi ile AuNP'lerin kristal yapısı doğrulanmıştır. 48 nm AuNP için 39,39°, 45,56°, 65,94°, 78,86° da gözlemlenen pikler sırasıyla (111), (200), (220) ve (311)'e karşılık gelmektedir. 31 nm AuNP için 39,34°, 45,56°, 65,82°, 78,74° da gözlemlenen pikler sırasıyla (111), (200), (220) ve (311)'e karşılık gelmektedir. 12 nm AuNP için 39,26°, 45,48°, 65,81°, 78,73° da gözlemlenen pikler sırasıyla (111), (200), (220) ve (311)'e karşılık gelmektedir. Al-Radadi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Ephedra bitki ekstraktı ile sentezlenen AuNP'lerin XRD pikleri sırasıyla, 38,1°, 44,51°, 64,61° ve 77,82° kırınım açılarında dört tepe noktasında

gözlemlenmiştir. Gözlemlenen piklerin yeşil AuNP'lerle iyi bir uyum içinde olduğu bildirilmiştir (Al-Radadi ve Journal, 2023). Bu sonuçlar bizim çalışma sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.

Ayrıca yapılan FE-SEM ve TEM analizinde AuNP'lerin ağırlıklı olarak küresel, üçgen ve hegzagonal şekiller olduğu ortaya çıkarılmıştır. Salep bitki ekstraktının konsantrasyonu arttıkça morfolojilerinin daha küresel olduğu ve çeşitliliğin azaldığı gözlemlenmiştir. Salep bitki ekstraktı miktarı arttıkça nanopartiküllerin boyutlarının küçüldüğü tespit edilmiştir. TEM analizine göre sentezlenen AuNP boyutları, Salep bitki ekstraktı konsantrasyonu artışına bağlı olarak sırasıyla  $48,909 \pm 21,850$  nm,  $31,005 \pm 15,371$  nm ve  $12,714 \pm 5,99$  nm olarak bulunmuştur. Sett ve arkadaşları, *Dillenia indica'nın* sulu meyve ekstraktını kullanarak AuNP sentezinin yeni bir yöntemini bildirmiştir. Güçlü bir antioksidan özelliğe sahip *D. indica'nın* sulu çekirdek ekstraktının yüksek fenolik içeriği, altın iyonlarının AuNP'lere indirgenmesini sağlamıştır. Meyve ekstraktında bulunan fitokimyasallar, AuNP'leri sentezlemek için etkili bir indirgeyici ve kapatma maddesi görevi görmektedir. AuNP'lerin TEM görüntüleri, çoğu biyolojik uygulama için oldukça ümit verici olan, ortalama 5-50 nm boyut aralığını ortaya çıkarmıştır. Sentezlenen AuNP'ler normal fibroblast hücre dizisi L929'da herhangi bir sitotoksosite göstermemiştir, dolayısıyla uyumlulukları kanıtlanmıştır (Sett, Gadewar, Sharma, Deka ve Bora, 2016). Elia ve diğerleri, *Salvia officinalis*, *Lippia citriodora*, *Pelargonium graveolens* ve *Punica granatum* olmak üzere dört farklı bitkinin ekstraktları kullanılarak sentezlenen AuNP'lerin biyoyumluluğunu ve stabilitesini karşılaştırmıştır. Kloroaurik iyonlar farklı bitkilerin ekstraktı ile işlendiğinde, altın iyonları altın atomlarına indirgenmiş ve bunlar daha sonra AuNP'ler oluşturmak üzere toplanmıştır. TEM görüntüleri sonucunda, boyutu yaklaşık 10 nm'den başlayan daha küçük küresel/üçgen NP'lerin oluşumunu gösterirken, üçgen, beşgen ve altıgen gibi farklı geometrik şekillerde daha büyük parçacıkların (~150 nm) da oluştuğunu bildirilmiştir. Sentezlenen tüm AuNP'lerin L hücreleri (bir fare fibroblast hücre çizgisi) üzerindeki sitotoksosite çalışmaları, 3 haftadan uzun süre boyunca zararlı etkiler göstermemekle birlikte biyoyumluluğu ve yüksek stabilizeyi de kanıtlamıştır. Bu nedenle sentezlenen NP'ler biyomedikal uygulamalarda uygulanma potansiyeline sahiptir. Literatür verileri, farklı bitkilerden elde edilen ekstraktlar kullanıldığında değişen geometrik şekillerde AuNP'lerin oluşumunu göstermiştir (R. Chen ve diğerleri, 2010; Tsuji ve diğerleri, 2007; Zeiri ve diğerleri, 2014).

Zeta potansiyeli analizi ile nanopartiküllerin negatif yüklü olduğu belirlenmiştir. Salep bitki ekstraktı konsantrasyonundaki artışla Zeta potansiyeli değerinin keskin bir şekilde gerilediği bulunmuştur. DLS analizinde PDI değerlerinin 0,3'ten küçük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç AuNP'lerin parçacık boyutunun homojen dağıldığını ve kararlı bir yapıya sahip olduklarını kanıtlamıştır. Yapılan bir çalışmada DLS ölçümleri, *Licorice* kök ekstraktı ile sentezlenen AuNP'lerin hidrodinamik çapının,  $55,22 \pm 42,86$  nm olduğunu gösterilmiştir. TEM ve DLS ölçümüyle parçacık çapındaki fark, DLS ölçümlerinin sentezlenen altın nanopartiküllerin yüzeyinde mevcut biyobileşiklerin kalınlığını içerdiği gerçeğini doğrulamıştır (Ahmad, Irfan ve Bhattacharjee, 2016). Zeta potansiyeli -26,5 mV olarak gözlemlenmiştir; bu sonuç AuNP'lerin 25 °C'de stabil olduğunu açıkça göstermektedir (Al-Radadi, 2021).

Yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla stabilitesi kanıtlanan AuNP'ler, NCI-H441 insan akciğer kanseri hücre hattı ve HUVEC hücre hattında uygulanması sonucu yüzde canlılık değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. AuNP'lerin biyomedikal uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için, kanserli hücrelerde iyi bir hücre sel alıma sahip olmaları ve terapötik hedefin yakınında bulunan normal hücrelere karşı toksisitelerini azaltmak amacıyla kanserli ve normal hücreler arasında ayırım yapabilme yetenekleri olması arzu edilmektedir (Mao, Kim, Son, Kim ve Yoo, 2018; Rizk, Christoforou ve Lee, 2016). Çalışmamız sonucunda, 48 nm AuNP için IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 900 µg/ml ve HUVEC hücre hattında 1108 µg/ml, 31 nm AuNP için IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 768 µg/ml ve HUVEC hücre hattında 808 µg/ml, 12 nm AuNP için IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 650 µg/ml ve HUVEC hücre hattında 754 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre sentezlenen nanopartiküllerimiz arzu edilen şekilde kanser hücrelerine kıyasla sağlıklı hücrelere karşı daha yüksek biyoyumluluk sergilemiştir. Tetrakloroaurik asit için IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 30.13 µg/ml ve HUVEC hücre hattında 12.74 µg/ml, Salep ekstraktı için IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 70.69 µg/ml ve HUVEC hücre hattında 71.42 µg/ml ve Celecoxib için IC<sub>50</sub> dozu NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattında 63.49 µM ve HUVEC hücre hattında 84.16 µM olarak bulunmuştur. IC<sub>50</sub> sonuçları kıyaslandığında, sentezlenen nanopartiküllerin, ana maddeleri olan Tetrakloroaurik asit ve Salep ekstraktına göre daha biyoyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Hosny ve diğeri, Afrika'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde yaygın olarak bulunan çiçekli bir bitki olan *Tecoma capensis*'in sulu yaprak ekstraktını kullanarak üç aya kadar stabil kalan AuNP'leri sentezlemek için bir fitofabrikasyon tekniğini açıklamıştır. *T. capensis*-AuNP'lerin antikanser etkinliği, MTT tahlili kullanılarak insan meme kanseri hücre hattı MCF7 üzerinde test edilmiştir. Sonuçlar, AuNP'lerin MCF7 hücrelerinin gelişimini ve çoğalmasını önlemede mükemmel potansiyelini ortaya çıkarmıştır (Hosny, Fawzy, El-Badry, Hussein ve Eltaweil, 2022). Yapılan bir çalışmada, *Mangifera indica* kullanılarak sentezlenen AuNP'lerle 400 µg/ml konsantrasyonda tedavi edilen HeLa hücreleri %67 hücre canlılığı ve meme kanseri hücreleri %58 hücre canlılığı gösterirken, normal fibroblast hücreleri %60 hücre canlılığı göstermiştir (Donga ve diğeri, 2020). Literatür bilgilerine kıyasla, Salep bitki ekstraktı ile sentezlediğimiz altın nanopartiküllerin yüksek biyoyumluluğa sahip olduğu gözlemlenmiştir. Enea ve diğeri, insan HepaRG hücrelerinde ve primer sıçan hepatositlerinde (PRH) farklı şekil ve boyutlardaki altın nanopartiküllerinin güvenliğini değerlendirmiştir. Test edilen tüm nanopartiküller arasında, daha küçük 15 nm küre şeklindeki nanopartiküller sitratla kapatıldığında en yüksek toksisiteyi ve artışı göstermiştir; daha düşük toksisite sunan AuNP'ler, 60 nm çaplı nanostarlardır. PRH, HepaRG hücreleriyle karşılaştırıldığında AuNP'leri daha verimli bir şekilde içselleştirmiştir ve alımın büyük ölçüde şekle, boyuta, kapatma maddesine ve zamana bağlı olduğu kanıtlanmıştır (Enea ve diğeri, 2021).

Celecoxib, antiinflatuar, analjezik ve antipiretik özelliklere sahip, steroid olmayan bir antiinflatuar ilaçtır (NSAID) (Clemett ve Goa, 2000). COX-2 inhibitörleri katalitik aktivitesini, prostaglandin (PG) ve tromboksan (Tx) üretimini inhibe ederek göstermektedir (Fu, Masferrer, Seibert, Raz ve Needleman, 1990; Needleman ve Isakson, 1997). Celecoxib aynı zamanda kanserin önlenmesinde de ümit verici olmuştur, potansiyel bir kanser kemopreventif ve terapötik ajan olarak değerlendirilmiştir. Kalıtsal kolon kanseri duyarlılık sendromu ve ailesel adenomatoz polipozis olan hastalarda adenomatöz kolorektal poliplerin sayısını azaltmak için cerrahiye yardımcı olarak kullanılmıştır (Arber ve diğeri, 2006; Steinbach ve diğeri, 2000).

Lin-Yang yaptığı bir çalışmada, HT-29 hücrelerinde PPAR $\gamma$ 'nın indüklediği apoptozun, kolon kanserinin bilinen bir destekleyicisi olan COX-2 protein ekspresyonunun downregülasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (W.-L. Yang, 2001). Antikanser aktivitesinin kesin mekanizmaları açık değildir ve hem COX'e bağımlı hem de COX'ten bağımsız mekanizmaları içerebilmektedir (Harris, 2009b; Schönthal, 2007).

Tümörle ilişkili çok çeşitli moleküler olaylar, *in vitro* analizlerde Celecoxib tarafından modüle edilir, ancak bunlar henüz klinik yanıtları açıkça tanımlanmamıştır. COX'tan bağımsız etkilerin çoğu yalnızca *in vitro* supratherapötik konsantrasyonlarda gözlemlenmiştir (Geisslinger, Schiffmann, Maier ve Grosh, 2006). Celecoxib için önerilen antikarsinojenik mekanizmalarında yer alan aday genlerin apoptozun indüksiyonu, hücre döngüsü durması, anjiyogenezin düzenlenmesi ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin indüksiyonunu içerdiğini göstermektedir. Hücre kültürü deneylerinde hücre döngüsü ilerlemesinin Celecoxib aracılı inhibisyonu, hücre döngüsü inhibitörleri p21 ve p27 ekspresyonunda artış ve/veya siklinlerin ekspresyonunda azalma ile gözlemlenmiştir (Dvory-Sobol ve diğerleri, 2006; C. Han, Leng, Demetris ve Wu, 2004; Patel ve diğerleri, 2005).

Çalışmamızda EMT süreci ile ilişkili CD36, PPAR $\gamma$ , TIMP2, MMP2, PGE2, COX-2 ve VEGFR2 gen ekspresyon seviyesindeki değişiklikleri incelemek amacıyla NCI-H441 hücre hattına 48 nm AuNP, 31 nm AuNP, 12 nm AuNP, Ekstrakt ve Celecoxib için belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında uygulanmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra NCI-H441 hücrelerinden RNA izole edilmiş ve cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA örnekleri ile yapılan qRT-PCR verilerinin analizinde 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> normalizasyon yöntemi kullanılmıştır. qRT-PCR sonuçlarından elde edilen Ct değerlerine göre NCI-H441 hücre hattında kontrol grubu ve doz uygulaması yapılan gruplar için hedef genlerin  $\beta$ - Actin housekeeping geni ile normalizasyonu ile 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yeşil sentezlenen AuNP uygulamasının, Ekstrakt ve Celecoxib ilacından daha iyi seviyede anti-anjiyogenik PPAR $\gamma$  ve ilişkili genler olan CD36 ve TIMP2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde upregüle ettiği ve EMT süreci ile ilgili olan MMP2, PGE2, COX-2 ve VEGFR2 genlerinin ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte 48 nm AuNP ve 12 nm AuNP'nin benzer etkiler göstermesinin nedeni 48 nm AuNP'nin şekil çeşitliliği ve 12 nm AuNP'nin daha küçük boyuta sahip olmasıyla ilgilidir.

Gen ekspresyon çalışmalarına ek olarak yapılan Western Blot çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. NCI-H441 hücre hattında MMP2 protein düzeyinde 48 nm AuNP (p<0.0001), 31 nm AuNP (p<0.0001), 12 nm AuNP (p<0.0001), Ekstrakt (p<0.0001) ve Celecoxib (p<0.0001) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir.

Bununla birlikte 12 nm AuNP'nin daha küçük boyuta sahip olması ile sitotoksitesi artarken ve 48 nm AuNP'nin şekil çeşitliliğinden dolayı protein düzeyini benzer şekilde baskıladığı düşünülmektedir. Celecoxib ile kombine verilen NP'ler arasında en iyi sonucu daha küresel formda olan 31 nm AuNP vermiştir. Ek olarak Salep Ekstraktı ve Celecoxib ilacının kombine tedavisi kanserin ilerlemesini inhibe etmek için potansiyel bir terapötik hedef olarak umut vaat etmektedir. Bununla birlikte Salep ekstraktı, COX-2 inhibitörü olan Celecoxibe göre COX-2 ve PGE2 gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha etkin downregüle etmektedir. Bu da Salep ekstraktının COX-2 inhibitörü terapötik ajanı olarak kullanım potansiyelide olduğunu düşündürmektedir. Bu veriler, COX-2 inhibitörü olan Celecoxib ve Ekstraktın kombine uygulanması sonucunda, PPAR $\gamma$  üzerinde biyolojik olarak anlamlı bir etkileşimin mevcut olduğunu ve PPAR $\gamma$ 'nın aktivasyonunun olduğunu açıkça göstermiştir.

Elde ettiğimiz veriler, EMT'nin inhibisyonu ve anti-anjiyogenez mekanizmasının indüklenmesi ile AuNP'lerin kanser ilerlemesini inhibe ettiğini kanıtlamaktadır. CD36 aracılı PPAR $\gamma$  aktivasyonu, apoptozu indükleyerek ve tümör mikrovasküler endotelial hücrelerinde COX-2 aracılı PGE2 ve VEGFR2 yolunu bloke ederek anjiyogenezi azaltmaktadır. Böylece anjiyogenez sırasında tüp oluşumunun engellenmesi yoluyla tümör hücrelerinin büyümesi inhibe edilmektedir. Bununla birlikte PPAR $\gamma$  aracılığıyla TIMP2 upregülasyonu, MMP-2'nin downregülasyonunu sağlayarak EMT sürecini inhibe etmektedir. Bu bulgular, agresif akciğer kanserinde *Orchis Spitzelii* (Salep) kök kısmının ekstraktı kullanılarak yeşil sentezlenen AuNP'lerin kullanımının yeni bir tedavi stratejisi olacağını düşündürmektedir.

Bu çalışmada, CD36 aracılı PPAR $\gamma$  aktivasyonunun, akciğer kanseri hücrelerinde MMP-2'nin indüklediği EMT'yi ve VEGFR2'nin indüklediği anjiyogenezi inhibe ettiğini ve metastazı önlediğini gösterdik. PPAR $\gamma$ 'nın AuNP'ler ile aktivasyonu, mezenkimal belirteç olan MMP2 ekspresyonunu önlemektedir. AuNP'lerin düşük toksisite profiliyle birlikte verilerimiz, bu nanopartiküllerin metastazı inhibe etmek için potansiyel terapötik ajanlar olarak hizmet edebileceğini göstermektedir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak *Orchis Spitzelii* (Salep) bitkisinin kök kısımlarının ekstraktında bulunan fonksiyonel gruplar aracılığıyla Au<sup>+</sup> iyonlarının indirgenerek AuNP sentezinin gerçekleştiği gösterildi ve sentez koşulları optimize edilerek AuNP üretimi sağlandı. Akciğer kanseri hücre hattı NCI-H441 ve sağlıklı hücre hattı HUVEC hücrelerinde uygulanan in vitro sitotoksite, RNA izolasyonu, cDNA sentezi, qRT-PCR deneysel çalışma sonuçları doğrultusunda, Salep bitkisinin kök kısımlarının sulu ekstraktı ile yeşil olarak sentezlediğimiz AuNP'lerin, NCI-H441 hücre hattında antikanser etki sergilediği bulgularına ulaşıldı. Yeşil sentezlenen nanopartiküllerimiz NCI-H441 akciğer kanseri hücre hattına kıyasla HUVEC sağlıklı hücre hattına karşı daha yüksek biyouyumluluk sergilemiştir. Bununla birlikte invazyon, metastaz, anjiyogenez, EMT, yağ asidi metabolizması ile ilgili hedef genler olan anti-anjiyogenik PPAR $\gamma$  CD36 gen ekspresyonunu upregüle ettiği ve VEGFR2, TIMP-2, MMP2, COX-2, PGE2 genlerinin ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle ettiği sonucuna ulaşıldı. Ek olarak yapılan protein tayini çalışmalarıyla, gen ekspresyonu çalışmasıyla benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MMP2 protein düzeylerinin baskılandığı tespit edildi.

Tüm veriler değerlendirildiğinde yeşil sentezlenen AuNP'lerin sağlıklı HUVEC hücrelerine daha az toksik etki göstermeleri nedeniyle yüksek biyouyumluluğa sahip oldukları ve PPAR $\gamma$  sinyal yolağı üzerinde etkili sonuçlar sergilediğinden kanser alanında potansiyel bir terapötik hedef olarak umut vaat etmektedir.

Sıcaklık, zaman, pH, ekstrakt ve tuz konsantrasyonu gibi sentez parametreleri optimize edilerek daha küçük boyutlu, monodispers ve daha stabil AuNP'ler sentezlenerek antikanser etkinliklerinin artması sağlanabilir. Antikanser etkinliklerinin yanı sıra antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkinlikleri değerlendirilebilir. Ayrıca AuNP'ler hedef hücrelere uyumlu ligandlarla kaplanarak ve kemoterapötik ilaç yüklemesi yapılarak belirlenen hedef hücrelere ilacın kontrollü salımı gerçekleştirilebilir. Böylece sağlıklı hücrelere karşı istenmeyen yan etkiler azaltılabilir. Hücresel alım çalışmaları ile nanopartikül şekline ve içselleştirme farklılıklarına bağlı olarak sitotoksik etkileri değerlendirilebilir.

Bununla birlikte manyetik altın nanopatiküller ile tümör bölgesinde üretilen seçici ışık emilimi ve hipertermi sonucunda sağlıklı dokulara zarar gelmeden tümör dokusunu tahrip eden Fototermal tedavi çalışmaları yapılabilir. Ayrıca radyolojide görüntüleme amacıyla uygulanması, yüksek penetrasyon ile duyarlılık ve özgüllük sağlamaları sayesinde geleneksel görüntüleme tekniklerindeki bazı sınırlamalarının üstesinden gelinebilir.

Yeşil sentezlenen AuNP'lerin moleküler düzeydeki etkilerinin açığa çıkarılabilmesi için PPAR $\gamma$  transkripsiyon faktörü ve onun hedef genlerinin gen ekspresyonuna etkisine ek olarak PPAR $\gamma$  sinyal yolağı ile ilişkili diğer yolaklar altında yatan moleküler mekanizmalar gen ekspresyonu ve protein düzeyinde çalışmalar ile araştırılmalıdır. Kanser ilerlemesini engellemek ve tedavi etmek amacıyla geleneksel antikanser ilaçlara alternatif olacak çevre dostu ve yüksek biyouyumluluğa sahip olan AuNP'lerin formülasyonu için in vitro çalışmaların in vivo ve in silico çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdul Salam, H., Sivaraj, R. ve Venckatesh, R. (2014). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* Benth.-Lamiaceae leaf extract. *Materials Letters*, *131*, 16-18. doi:10.1016/j.matlet.2014.05.033
- Adams, M., Reginato, M. J., Shao, D., Lazar, M. A. ve Chatterjee, V. K. (1997). Transcriptional Activation by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Is Inhibited by Phosphorylation at a Consensus Mitogen-activated Protein Kinase Site. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(8), 5128-5132. doi:10.1074/jbc.272.8.5128
- Aghaie, T., Jazayeri, M. H., Manian, M., Khani, leila, Erfani, M., Rezayi, M., ... Avan, A. (2019). Gold nanoparticle and polyethylene glycol in neural regeneration in the treatment of neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(3), 2749-2755. doi:10.1002/jcb.27415
- Aghebati-Maleki, A., Dolati, S., Ahmadi, M., Baghbanzhadeh, A., Asadi, M., Fotouhi, A., ... Aghebati-Maleki, L. (2020). Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *Journal of Cellular Physiology*, *235*(3), 1962-1972. doi:10.1002/jcp.29126
- Ahmad, T., Irfan, M. ve Bhattacharjee, S. (2016). Parametric Study on Gold Nanoparticle Synthesis Using Aqueous *Elaise Guineensis* (Oil palm) Leaf Extract: Effect of Precursor Concentration. *Procedia Engineering*, *148*, 1396-1401. doi:10.1016/j.proeng.2016.06.558
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L. ve Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, *7*(1), 17-28. doi:10.1016/j.jare.2015.02.007
- Ahmed, S., Annu, Ikram, S. ve Yudha S., S. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *161*, 141-153. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034
- Ajnai, G., Chiu, A., Kan, T., Cheng, C. C., Tsai, T. H. ve Chang, J. (2014, 1 Aralık). Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. *Journal of Experimental and Clinical Medicine (Taiwan)*. Elsevier Taiwan LLC. doi:10.1016/j.jecm.2014.10.015

- Akhurst, T. (2018). Staging of Non–Small-Cell Lung Cancer. *PET Clinics*, 13(1), 1-10. doi:10.1016/J.CPET.2017.09.004
- Akiyama, T. E., Meinke, P. T. ve Berger, J. P. (2005). PPAR ligands: Potential therapies for metabolic syndrome. *Current Diabetes Reports*, 5(1), 45-52. doi:10.1007/s11892-005-0067-3
- Akkoçlu, A. (2006). *Akciğer Kanserleri*.
- Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M. ve Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of Lung Cancer. *Chest*, 143(5), e1S-e29S. doi:10.1378/chest.12-2345
- Albrektsen, T., Frederiksen, K. S., Holmes, W. E., Boel, E., Taylor, K. ve Fleckner, J. (2002). Novel Genes Regulated by the Insulin Sensitizer Rosiglitazone During Adipocyte Differentiation. *Diabetes*, 51(4), 1042-1051. doi:10.2337/diabetes.51.4.1042
- Alkilany, A. M. , ve Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles, what we have learned so far. *Journal of nanoparticle research*, 12(7), 2313-2333.
- Al-Radadi, N. S. (2021). Facile one-step green synthesis of gold nanoparticles (AuNp) using licorice root extract: Antimicrobial and anticancer study against HepG2 cell line. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(2), 102956. doi:10.1016/j.arabjc.2020.102956
- Al-Radadi, N. S. ve Journal, A. (2023). Ephedra mediated green synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and evaluation of its antioxidant, antipyretic, anti-asthmatic, and antimicrobial properties Production and hosting by Elsevier, 16, 104353. doi:10.1016/j.arabjc.2022.104353
- Amendola, V. ve Meneghetti, M. (2009). Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(11), 4277-4285. doi:10.1021/jp8082425
- Anjum AA, Tabassum K ve Ambar S. (2019). Medicinal properties and uses of Salabmisri (*Orchis latifolia* Linn): A literary review. *J Phytopharmacol*, 8(1), 18-20.
- Antonicelli, A. , Cafarotti, S. , Indini, A. , Galli, A. , Russo, A. , Cesario, A. , ve Dutly, A. E. (2013). EGFR-Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer Focus on EGFR Oncogenic Mutation. *International journal of medical sciences*, 10(3), 320.
- Arat, A., Zeybek, Ü., Yılmaz, N., Fazlıoğulları, O., Çelik, F., Başaran, C. ve Zeybek, Ü. (2020). Effects of Leptin, Resistin, and PPAR-Gama Gene Variants on Obese

- Patients with Acute Coronary Syndrome in the Turkish Population. *Journal of Academic Research in Medicine*, 10(2), 166-174. doi:10.4274/jarem.galenos.2020.2931
- Arber, N., Eagle, C. J., Spicak, J., Rácz, I., Dite, P., Hajer, J., ... Levin, B. (2006). Celecoxib for the Prevention of Colorectal Adenomatous Polyps. *New England Journal of Medicine*, 355(9), 885-895. doi:10.1056/NEJMoa061652
- Arbour, K. C. ve Riely, G. J. (2019). Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA*, 322(8), 764. doi:10.1001/jama.2019.11058
- Arıncı, K. , ve Elhan, A. (2006). *Anatomi* (4. bs., C. 54-7). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Arvizo, R. R., Rana, S., Miranda, O. R., Bhattacharya, R., Rotello, V. M. ve Mukherjee, P. (2011). Mechanism of anti-angiogenic property of gold nanoparticles: Role of nanoparticle size and surface charge. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(5), 580-587. doi:10.1016/j.nano.2011.01.011
- Asamura, H., Chansky, K., Crowley, J., Goldstraw, P., Rusch, V. W., Vansteenkiste, J. F., ... Rami-Porta, R. (2015). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(12), 1675-1684. doi:10.1097/JTO.0000000000000678
- Atashpour, S., Kargar Jahromi, H., Kargar Jahromi, Z. ve Zarei, S. (2017). Antioxidant effects of aqueous extract of Salep on Paraquat-induced rat liver injury. *World Journal of Hepatology*, 9(4), 209. doi:10.4254/wjh.v9.i4.209
- Atrice, B. É., And, D. ve Wahli, W. (1999). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism\*. <https://academic.oup.com/edrv/article/20/5/649/2530847> adresinden erişildi.
- Auwerx, J. (1999). PPAR $\gamma$ , the ultimate thrifty gene. *Diabetologia*, 42(9), 1033-1049. doi:10.1007/s001250051268
- Bade, B. C. ve Dela Cruz, C. S. (2020, 1 Mart). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*. W.B. Saunders. doi:10.1016/j.ccm.2019.10.001
- Bae, J.-M. ve Kim, E. H. (2015). Human papillomavirus infection and risk of lung cancer in never-smokers and women: an 'adaptive' meta-analysis. *Epidemiology and Health*, 37, e2015052. doi:10.4178/epih/e2015052

- Baig, N., Kammakakam, I. ve Falath, W. (2021). Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821-1871. doi:10.1039/D0MA00807A
- Balmes, J. R. (2019). Household air pollution from domestic combustion of solid fuels and health. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(6), 1979-1987. doi:10.1016/j.jaci.2019.04.016
- Bardajee, G. R. , Hooshyar, Z. , ve Kabiri, F. (2012). Preparation and investigation on swelling and drug delivery properties of a novel silver/salep-g-poly (acrylic acid) nanocomposite hydrogel. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(8), 2635-2641.
- Baytop, T. , ve Sezik, E. (1968). Türk salep çeşitleri üzerinde araştırmalar. *Journal of the Faculty of Pharmacology*, 4, 61-68.
- Becheri, A. , ve Dürr, M. (2008). *Nanopart. Res.* (P. Lo Nostro ve P. J. Baglioni, Ed.) (C. 10).
- Bemidinezhad, A., Mirzavi, F., Gholamhosseinian, H., Gheybi, F. ve Soukhtanloo, M. (2023). Gold-containing liposomes and glucose-coated gold nanoparticles enhances the radiosensitivity of B16F0 melanoma cells via increasing apoptosis and ROS production. *Life Sciences*, 318, 121495. doi:10.1016/J.LFS.2023.121495
- Berger, J. ve Moller, D. E. (2002). The Mechanisms of Action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, 53(1), 409-435. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104018
- Bhattacharjee, S. K. (2006). Herbaceous perennials and shade loving foliage plants. . *Pointer Publishers*.
- Bhattacharya, R. ve Mukherjee, P. (2008, 17 Ağustos). Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2008.03.013
- Blanquart, C., Barbier, O., Charles Fruchart, J., Staels, B. ve Glineur, C. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 85, 267-273. doi:10.1016/S0960-0760(03)00214-0
- Bleeker, E. A. J., de Jong, W. H., Geertsma, R. E., Groenewold, M., Heugens, E. H. W., Koers-Jacquemijns, M., ... Oomen, A. G. (2013). Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(1), 119-125. doi:10.1016/j.yrtph.2012.11.007

- Blobaum, A. L. ve Marnett, L. J. (2007). Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(7), 1425-1441. doi:10.1021/jm0613166
- Boroumand Moghaddam, A., Namvar, F., Moniri, M., Md. Tahir, P., Azizi, S. ve Mohamad, R. (2015). Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. *Molecules*, 20(9), 16540-16565. doi:10.3390/molecules200916540
- Bouché, M., Hsu, J. C., Dong, Y. C., Kim, J., Taing, K. ve Cormode, D. P. (2020). Recent Advances in Molecular Imaging with Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 31(2), 303-314. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00669
- Bouwens, M., Afman, L. A. ve Müller, M. (2007). Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid  $\beta$ -oxidation: functional role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in human peripheral blood mononuclear cells. *The American journal of clinical nutrition*, 86(5), 1515-1523.
- Boyle, P. , ve Levin, B. (2008). *World cancer report 2008*. IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. ve Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brenner, D. R., McLaughlin, J. R. ve Hung, R. J. (2011). Previous Lung Diseases and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 6(3), e17479. doi:10.1371/journal.pone.0017479
- Buccheri, G. (2004). Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *European Respiratory Journal*, 24(6), 898-904. doi:10.1183/09031936.04.00113603
- Cai, F., Li, S., Huang, H., Iqbal, J., Wang, C. ve Jiang, X. (2022). Green synthesis of gold nanoparticles for immune response regulation: Mechanisms, applications, and perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(2), 424-442. doi:10.1002/jbm.a.37281
- Camargo Barros-Filho, M., Guisier, F., D. Rock, L., D. Becker-Santos, D., P. Sage, A., A. Marshall, E. ve L. Lam, W. (2019). Tumour Suppressor Genes with Oncogenic

- Roles in Lung Cancer. *Genes and Cancer* içinde . IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.85017
- Camp, H. S. ve Tafuri, S. R. (1997). Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Activity by Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10811-10816. doi:10.1074/jbc.272.16.10811
- Cappuzzo, F., Hirsch, F. R., Rossi, E., Bartolini, S., Ceresoli, G. L., Bemis, L., ... Varellaga-Garcia, M. (2005). Epidermal Growth Factor Receptor Gene and Protein and Gefitinib Sensitivity in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 97(9), 643-655. doi:10.1093/jnci/dji112
- Cardona, A. F. , Rosell, R. , Vargas, C. , Carranza, H. , Archila, P. , Otero, J. M. , ve Giannikopoulos, P. (2013). EGFR and KRAS mutations in patients having lung adenocarcinoma associated with human papilloma virus infection. *In Journal of Thoracic Oncology*, 8, S428-S428.
- Carper, M. B. ve Claudio, P. P. (2015). Clinical potential of gene mutations in lung cancer. *Clinical and Translational Medicine*, 4(1). doi:10.1186/s40169-015-0074-1
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023, 31 Temmuz). [https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic\\_info/what-is-lung-cancer.htm](https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/what-is-lung-cancer.htm).
- Chae, Y. K., Chang, S., Ko, T., Anker, J., Agte, S., Iams, W., ... Cruz, M. (2018). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) signature is inversely associated with T-cell infiltration in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Scientific Reports*, 8(1), 2918. doi:10.1038/s41598-018-21061-1
- Chaffer, C. L., Thompson, E. W. ve Williams, E. D. (2007). Mesenchymal to Epithelial Transition in Development and Disease. *Cells Tissues Organs*, 185(1-3), 7-19. doi:10.1159/000101298
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S. ve Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13926-13931. doi:10.1073/pnas.162468699
- Chatterjee, P. ve Kumar, S. (2022). Current developments in nanotechnology for cancer treatment. *Materials Today: Proceedings*, 48, 1754-1758. doi:10.1016/j.matpr.2021.10.048

- Chen, H., Zeng, Y., Liu, W., Zhao, S., Wu, J. ve Du, Y. (2013). Multifaceted applications of nanomaterials in cell engineering and therapy. *Biotechnology Advances*, 31(5), 638-653. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.08.002
- Chen, Jiarong, Liu, A., Lin, Z., Wang, B., Chai, X., Chen, S., ... Huang, Y. (2020). Downregulation of the circadian rhythm regulator HLF promotes multiple-organ distant metastases in non-small cell lung cancer through PPAR/NF- $\kappa$ b signaling. *Cancer Letters*, 482, 56-71. doi:10.1016/j.canlet.2020.04.007
- Chen, Jingqin, Li, Y., Fang, G., Cao, Z., Shang, Y., Alfarraj, S., ... Duan, X. (2021). Green synthesis, characterization, cytotoxicity, antioxidant, and anti-human ovarian cancer activities of *Curcumae kwangsiensis* leaf aqueous extract green-synthesized gold nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(3), 103000. doi:10.1016/j.arabjc.2021.103000
- Chen, R., Wu, J., Li, H., Cheng, G., Lu, Z. ve Che, C.-M. (2010). Fabrication of gold nanoparticles with different morphologies in HEPES buffer. *Rare Metals*, 29(2), 180-186. doi:10.1007/s12598-010-0031-5
- Chen, T.-H., Pan, S.-L., Guh, J.-H., Liao, C.-H., Huang, D.-Y., Chen, C.-C. ve Teng, C.-M. (2008). Moscatilin Induces Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells: A Crucial Role of c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Protein Kinase Activation Caused by Tubulin Depolymerization and DNA Damage. *Clinical Cancer Research*, 14(13), 4250-4258. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4578
- Choudhury, P. ve Das, P. K. (2021). Progress and trends in self-assembly driven fluorescent organic nanoparticles: A brief overview. *Journal of the Indian Chemical Society*, 98(9), 100123. doi:10.1016/j.jics.2021.100123
- Chowdhury, A. (2016). A diverse role of MMP-2 and MMP-9 in the onset of alzheimer disease and cancer. *Austin Neurol & Neurosci*, 1, 1011-1015.
- Chu, L.-Y., Ramakrishnan, D. P. ve Silverstein, R. L. (2013). Thrombospondin-1 modulates VEGF signaling via CD36 by recruiting SHP-1 to VEGFR2 complex in microvascular endothelial cells. *Blood*, 122(10), 1822-1832. doi:10.1182/blood-2013-01-482315
- Clemett, D. ve Goa, K. L. (2000). Celecoxib. *Drugs*, 59(4), 957-980. doi:10.2165/00003495-200059040-00017
- Connor, E. E. , Mwamuka, J. , Gole, A. , Murphy, C. J. , ve Wyatt, M. D. (2005). Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small*, 1(3), 325-327.

- Corrales, L., Rosell, R., Cardona, A. F., Martín, C., Zatarain-Barrón, Z. L. ve Arrieta, O. (2020). Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 148, 102895. doi:10.1016/j.critrevonc.2020.102895
- Costigan, M., Karim, N., Di, L., Mannelli, C., Lins, N., Quintão, M., ... Costa, R. (2019). Pharmacological Treatment of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: PPAR $\gamma$  Agonists as a Promising Tool. doi:10.3389/fnins.2019.00907
- Coşkun, H. S. ve Dabak, N. (2019). Akciğer kanseri kemik metastazları. *TOTBID Dergisi*, 18(6). doi:10.14292/totbid.dergisi.2019.75
- Crofford, L. J. , Lipsky, P. E. , Brooks, P. , Abramson, S. B. , Simon, L. S. , ve Van De Putte, L. (2000). Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* , 43(1), 4-13.
- Cuneo, K. C., Nyati, M. K., Ray, D. ve Lawrence, T. S. (2015). EGFR targeted therapies and radiation: Optimizing efficacy by appropriate drug scheduling and patient selection. *Pharmacology & Therapeutics*, 154, 67-77. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.07.002
- Curulli, A. (2020). Nanomaterials in Electrochemical Sensing Area: Applications and Challenges in Food Analysis. *Molecules*, 25(23), 5759. doi:10.3390/molecules25235759
- Çok, G. (2018). TNM Staging of Lung Cancer. *Nükleer Tıp Seminerleri*, 4(1), 1-5. doi:10.4274/nts.2018.001
- da Cunha Santos, G., Shepherd, F. A. ve Tsao, M. S. (2011). EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 49-69. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130206
- Dai, J., Lv, J., Zhu, M., Wang, Y., Qin, N., Ma, H., ... Shen, H. (2019). Identification of risk loci and a polygenic risk score for lung cancer: a large-scale prospective cohort study in Chinese populations. *The Lancet Respiratory Medicine*, 7(10), 881-891. doi:10.1016/S2213-2600(19)30144-4
- Darweesh, R. S., Ayoub, N. M. ve Nazzal, S. (2019). Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine, Volume 14*, 7643-7663. doi:10.2147/IJN.S223941
- de Fraipont, F., Nicholson, A. C., Feige, J.-J. ve Van Meir, E. G. (2001). Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends in Molecular Medicine*, 7(9), 401-407. doi:10.1016/S1471-4914(01)02102-5

- de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W. ve Munden, R. F. (2018). The epidemiology of lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 7(3), 220-233. doi:10.21037/tlcr.2018.05.06
- de Margerie-Mellon, C., de Bazelaire, C. ve de Kerviler, E. (2016). Image-guided biopsy in primary lung cancer: Why, when and how. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 97(10), 965-972. doi:10.1016/j.diii.2016.06.016
- DeFilippis, R. A., Chang, H., Dumont, N., Rabban, J. T., Chen, Y.-Y., Fontenay, G. V., ... Tlsty, T. D. (2012). CD36 Repression Activates a Multicellular Stromal Program Shared by High Mammographic Density and Tumor Tissues. *Cancer Discovery*, 2(9), 826-839. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0107
- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. ve Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *CME*, 32, 605-644. doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001
- Deng, B., Li, Y., Zhang, Y., Bai, L. ve Yang, P. (2013). Helicobacter pylori infection and lung cancer: a review of an emerging hypothesis. *Carcinogenesis*, 34(6), 1189-1195. doi:10.1093/carcin/bgt114
- Denisenko, T. V., Budkevich, I. N. ve Zhivotovsky, B. (2018). Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. *Cell Death & Disease*, 9(2), 117. doi:10.1038/s41419-017-0063-y
- Desai, M. A. , Mehta, S. , Smith, K. R. , ve World Health Organization. (2004). *Indoor smoke from solid fuels: assessing the environmental burden of disease at national and local levels*. World Health Organization.
- Detterbeck, F. C., Mazzone, P. J., Naidich, D. P. ve Bach, P. B. (2013). Screening for Lung Cancer. *Chest*, 143(5), e78S-e92S. doi:10.1378/chest.12-2350
- Dicitore, A. , Caraglia, M. , Colao, A. , Zappavigna, S. , Hofland, L. J. , Vitale, G. ve Mari, D. .. (2013). Combined treatment with PPAR- $\gamma$  agonists in pancreatic cancer: a glimmer of hope for cancer therapy? *Current cancer drug targets*, 13(4), 460-471.
- Dogan, M. ve Kayacier, A. (2004). Rheological Properties of Reconstituted Hot Salep Beverage. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 683-691. doi:10.1081/JFP-200033093
- Donga, S., Bhadu, G. R. ve Chanda, S. (2020). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of gold nanoparticles green synthesized using *Mangifera indica* seed aqueous extract. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 48(1), 1315-1325. doi:10.1080/21691401.2020.1843470

- Dowell, J. E. (2010). Small Cell Lung Cancer: Are We Making Progress? *The American Journal of the Medical Sciences*, 339(1), 68-76. doi:10.1097/MAJ.0B013E3181BCCEF5
- Downward, G. S., Hu, W., Rothman, N., Reiss, B., Tromp, P., Wu, G., ... Vermeulen, R. (2017). Quartz in ash, and air in a high lung cancer incidence area in China. *Environmental Pollution*, 221, 318-325. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.081
- Dubitsky, A., DeCollibus, D. ve Ortolano, G. A. (2002). Sensitive fluorescent detection of protein on nylon membranes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51(1), 47-56. doi:10.1016/S0165-022X(01)00243-3
- Durmuşkahya, C., Akyol, Y. ve Özdemir, C. (2015). Ecology, anatomy and morphology of *Orchis spitzelii* in Turkey. *Journal of environmental biology*, 36 Spec No, 177-84.
- Dvory-Sobol, H., Cohen-Noyman, E., Kazanov, D., Figer, A., Birkenfeld, S., Madar-Shapiro, L., ... Arber, N. (2006). Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *European Journal of Cancer*, 42(3), 422-426. doi:10.1016/j.ejca.2005.11.009
- Ece Tamer, C., Karaman, B. ve Utku Copur, O. (2006). A Traditional Turkish Beverage: Salep. *Food Reviews International*, 22(1), 43-50. doi:10.1080/87559120500379902
- El-Sherief, A. H., Lau, C. T., Wu, C. C., Drake, R. L., Abbott, G. F. ve Rice, T. W. (2014). International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) Lymph Node Map: Radiologic Review with CT Illustration. *RadioGraphics*, 34(6), 1680-1691. doi:10.1148/rg.346130097
- Enea, M., Pereira, E., Costa, J., Soares, M. E., Dias da Silva, D., Bastos, M. de L. ve Carmo, H. F. (2021). Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles on two distinct hepatic cell models. *Toxicology in Vitro*, 70, 105046. doi:10.1016/j.tiv.2020.105046
- Escher, P. ve Wahli, W. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 448(2), 121-138. doi:10.1016/S0027-5107(99)00231-6
- Evans, R. M. ve Mangelsdorf, D. J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*, 157(1), 255-266. doi:10.1016/j.cell.2014.03.012
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspé, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.-M., Saladin, R., ... Auwerx, J. (1997). The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the

- Human PPAR $\gamma$  Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18779-18789. doi:10.1074/jbc.272.30.18779
- Fajas, L., Fruchart, J.-C. ve Auwerx, J. (1998). PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters*, 438(1-2), 55-60. doi:10.1016/S0014-5793(98)01273-3
- Falk, S. ve Williams, C. (2010). Chapter 1 Lung Cancer—the facts. *Lung Cancer—the facts* içinde (Oxford University., C. 3, ss. 3-4). England.
- Farhoosh, R. ve Riazi, A. (2007). A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 660-666. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.07.021
- Friedmann, P. S., Cooper, H. L. ve Healy, E. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptors and their relevance to dermatology. *Acta Dermato-Venereologica*. doi:10.1080/00015550510030104
- Früh, M., De Ruyscher, D., Popat, S., Crinò, L., Peters, S. ve Felip, E. (2013). Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24(SUPPL.6). doi:10.1093/annonc/mdt178
- Fu, J. Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A. ve Needleman, P. (1990). The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 16737-16740. doi:10.1016/S0021-9258(17)44821-6
- Geisslinger, G. , Schiffmann, S. , Maier, T. J. , ve Grosh, S. (2006). Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Independent Anticarcinogenic Effect of selective COX-2 Inhibitor. *Journal of National Cancer Institute*, 98(11), 736-747.
- Gemici, Y. , Duman, H., Ekim, T. ve Alagöz, Z. (2004). *Handbook of threatened and endemic plant species* . Ankara.
- Gharsalli, H., Mlika, M., Sahnoun, I., Maalej, S., Douik El Gharbi, L. ve Mezni, F. El. (2018). The utility of bronchoalveolar lavage in the evaluation of interstitial lung diseases: A clinicopathological perspective. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 35(5), 280-287. doi:10.1053/j.semmp.2018.08.003
- Gheldof, A. ve Berx, G. (2013). Cadherins and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (ss. 317-336). doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. ve Rotello, V. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1307-1315. doi:10.1016/j.addr.2008.03.016

- Gilde, A. J., Fruchart, J. C. ve Staels, B. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors at the crossroads of obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(9S), A24-A32.
- Gleiter, H. (2000). Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Materialia*, 48(1), 1-29. doi:10.1016/S1359-6454(99)00285-2
- GLOBOCAN. (2020). Cancer Today . IARC.
- Gnach, A., Lipinski, T., Bednarkiewicz, A., Rybka, J. ve Capobianco, J. A. (2015). Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1561-1584. doi:10.1039/C4CS00177J
- Goldstraw, P., Ball, D., Jett, J. R., Le Chevalier, T., Lim, E., Nicholson, A. G. ve Shepherd, F. A. (2011). Non-small-cell lung cancer. *Lancet* , 378, 1727-1740. doi:10.1016/S0140
- Gou, Q., Gong, X., Jin, J., Shi, J. ve Hou, Y. (2017). *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are potential drug targets for cancer therapy. Oncotarget (C. 8)*. www.impactjournals.com/oncotarget/ adresinden erişildi.
- Gravdal, K., Halvorsen, O. J., Haukaas, S. A. ve Akslen, L. A. (2007). A Switch from E-Cadherin to N-Cadherin Expression Indicates Epithelial to Mesenchymal Transition and Is of Strong and Independent Importance for the Progress of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(23), 7003-7011. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1263
- Grieve M. (1989). *A modern herbal the medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folk-lore of herbs, grasses, fungi, shrubs and trees with their modern scientific uses*. New York.
- Guan, Y. ve Breyer, M. D. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney International*, 60, 14-30.
- Gudikandula, K. ve Charya Maringanti, S. (2016). Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(9), 714-721. doi:10.1080/17458080.2016.1139196
- Gürmen, S., Ebin, B. ve İtü, M. (2008). Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *Metalurji Dergisi*, 150, 31-38.
- Hadinoto, K., Sundaresan, A. ve Cheow, W. S. (2013). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 427-443. doi:10.1016/j.ejpb.2013.07.002

- Hamra, G. B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J. M., ... Loomis, D. (2014). Outdoor Particulate Matter Exposure and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives*, 122(9), 906-911. doi:10.1289/ehp/1408092
- Han, C., Leng, J., Demetris, A. J. ve Wu, T. (2004). Cyclooxygenase-2 Promotes Human Cholangiocarcinoma Growth. *Cancer Research*, 64(4), 1369-1376. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-1086
- Han, L., Shen, W.-J., Bittner, S., Kraemer, F. B. ve Azhar, S. (2017). PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- $\beta/\delta$  and PPAR- $\gamma$ . *Future Cardiology*, 13(3), 279-296. doi:10.2217/fca-2017-0019
- Han, S. ve Roman, J. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : a novel target for cancer therapeutics? *Anti-Cancer Drugs*, 18(3), 237-244. doi:10.1097/CAD.0b013e328011e67d
- Harris, R. E. (2009a). Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology*, 17(2), 55-67. doi:10.1007/s10787-009-8049-8
- Harris, R. E. (2009b). Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology*, 17(2), 55-67. doi:10.1007/s10787-009-8049-8
- Hasan, M., Ullah, I., Zulfikar, H., Naeem, K., Iqbal, A., Gul, H., ... Mahmood, N. (2018). Biological entities as chemical reactors for synthesis of nanomaterials: Progress, challenges and future perspective. *Materials Today Chemistry*, 8, 13-28. doi:10.1016/j.mtchem.2018.02.003
- Hay, E. D. (1995). An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Cells Tissues Organs*, 154(1), 8-20. doi:10.1159/000147748
- Hernández-Ramírez, R. U., Shiels, M. S., Dubrow, R. ve Engels, E. A. (2017). Cancer risk in HIV-infected people in the USA from 1996 to 2012: a population-based, registry-linkage study. *The Lancet HIV*, 4(11), e495-e504. doi:10.1016/S2352-3018(17)30125-X
- Hoffman, R. M. ve Sanchez, R. (2017). Lung Cancer Screening. *Medical Clinics of North America*, 101(4), 769-785. doi:10.1016/j.mcna.2017.03.008
- Hosny, M., Fawzy, M., Abdelfatah, A. M., Fawzy, E. E. ve Eltaweil, A. S. (2021). Comparative study on the potentialities of two halophytic species in the green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer, antioxidant and catalytic

- efficiencies. *Advanced Powder Technology*, 32, 3220-3233. doi:10.1016/j.appt.2021.07.008
- Hosny, M., Fawzy, M., El-Badry, Y. A., Hussein, E. E. ve Eltaweil, A. S. (2022). Plant-assisted synthesis of gold nanoparticles for photocatalytic, anticancer, and antioxidant applications. *Journal of Saudi Chemical Society*, 26(2), 101419. doi:10.1016/j.jscs.2022.101419
- Hossain, M. M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances — An overview. *Fitoterapia*, 82(2), 102-140. doi:10.1016/j.fitote.2010.09.007
- Hosseini, S. H., Zohreh, N., Karimi, N., Gaeini, N., Alipour, S., Seidi, F. ve Gholipour, N. (2020). Magnetic nanoparticles double wrapped into cross-linked salep/PEGylated carboxymethyl cellulose; a biocompatible nanocarrier for pH-triggered release of doxorubicin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 994-1006. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.05.040
- <https://bit.ly/3IRm2Vi>. (2022). How do you know if you are at risk for lung cancer? *Lung Cancer Foundation of America*. 21 Mart 2022 tarihinde [https://lcfamerica.org/lung-cancer-info/lung-cancer-risks/?gclid=Cj0KCQjwjPaCBhDkARIsAISZN7SwCpKI9iEdwMX7Gvfb9-8-q2o2-\\_hJxK\\_FVo7iKeGVc5jVnuzlsEoaAh-ZEALw\\_wcB](https://lcfamerica.org/lung-cancer-info/lung-cancer-risks/?gclid=Cj0KCQjwjPaCBhDkARIsAISZN7SwCpKI9iEdwMX7Gvfb9-8-q2o2-_hJxK_FVo7iKeGVc5jVnuzlsEoaAh-ZEALw_wcB) adresinden erişildi.
- Huang, K., Liang, Q., Zhou, Y., Jiang, L., Gu, W., Luo, M., ... Shen, Y. (2019). A Novel Allosteric Inhibitor of Phosphoglycerate Mutase 1 Suppresses Growth and Metastasis of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cell Metabolism*, 30(6), 1107-1119.e8. doi:10.1016/j.cmet.2019.09.014
- Hulla, J., Sahu, S. ve Hayes, A. (2015). Nanotechnology. *Human & Experimental Toxicology*, 34(12), 1318-1321. doi:10.1177/09603271155603588
- Husen, A. ve Siddiqi, K. S. (2014). Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 229. doi:10.1186/1556-276X-9-229
- Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H. ve Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology Letters*, 38(4), 545-560. doi:10.1007/s10529-015-2026-7
- Hvidtfeldt, U. A., Severi, G., Andersen, Z. J., Atkinson, R., Bauwelinck, M., Bellander, T., ... Fecht, D. (2021). Long-term low-level ambient air pollution exposure and risk of lung cancer – A pooled analysis of 7 European cohorts. *Environment International*, 146, 106249. doi:10.1016/j.envint.2020.106249

- Inamura, K. (2017). Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in oncology*, 7, 193.
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638. doi:10.1039/c1gc15386b
- Issemann, I. ve Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294), 645-650. doi:10.1038/347645a0
- Jacob, J. M., Sharma, S. ve Balakrishnan, R. M. (2017). Exploring the fungal protein cadre in the biosynthesis of PbSe quantum dots. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 54-61. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.12.056
- Jacobsen, M. M., Silverstein, S. C., Quinn, M., Waterston, L. B., Thomas, C. A., Benneyan, J. C. ve Han, P. K. J. (2017). Timeliness of access to lung cancer diagnosis and treatment: A scoping literature review. *Lung Cancer*, 112, 156-164. doi:10.1016/j.lungcan.2017.08.011
- Jagdale, S. P. , Shimpi, S. , ve Chachad, D. (2009). Pharmacological studies of 'Salep'. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 3(1), 153-156.
- Jahnel, J., Fleischer, T. ve Seitz, S. B. (2013). Risk assessment of nanomaterials and nanoproductions – adaptation of traditional approaches. *Journal of Physics: Conference Series*, 429, 012063. doi:10.1088/1742-6596/429/1/012063
- Jahromi, H. K. , Jashni, H. K. , Sameni, H. , Abedi, H. A. , Jahromi, Z. K. , ve Kherameh, Z. K. (2016). The effect of aqueous extract of *Dactylorhiza maculate* root on the concentration of hypothalamic-pituitary-thyroid Axis hormones in adult female rats. *Psychol. Chall. Curr. Res*, 5(5), 248-252.
- Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. ve El-Sayed, M. A. (2006). Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14), 7238-7248. doi:10.1021/jp057170o
- Jain, S., Hirst, D. G. ve O'Sullivan, J. M. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *The British Journal of Radiology*, 85(1010), 101-113. doi:10.1259/bjr/59448833
- Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H. ve Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101174. doi:10.1016/j.jddst.2019.101174

- Javed, R., Zia, M., Naz, S., Aisida, S. O., Ain, N. ul ve Ao, Q. (2020). Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: recent trends and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 172. doi:10.1186/s12951-020-00704-4
- Jay, M. ve Ren, J. (2007). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) in Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reviews*, 3(1), 33-39. doi:10.2174/157339907779802067
- Joseph, T. ve Morrison, M. (2006). Nanotechnology in agriculture and food. *Nanoforum report*, 2(2), 3.
- Ju, Y., Dong, B., Yu, J. ve Hou, Y. (2019). Inherent multifunctional inorganic nanomaterials for imaging-guided cancer therapy. *Nano Today*, 26, 108-122. doi:10.1016/j.nantod.2019.03.006
- Karacosta, L. G., Anchang, B., Ignatiadis, N., Kimmey, S. C., Benson, J. A., Shrager, J. B., ... Plevritis, S. K. (2019). Mapping lung cancer epithelial-mesenchymal transition states and trajectories with single-cell resolution. *Nature Communications*, 10(1), 5587. doi:10.1038/s41467-019-13441-6
- Karai, E., Szebényi, K., Windt, T., Fehér, S., Szendi, E., Dékay, V., ... Füredi, A. (2020). Celecoxib Prevents Doxorubicin-Induced Multidrug Resistance in Canine and Mouse Lymphoma Cell Lines. *Cancers*, 12(5), 1117. doi:10.3390/cancers12051117
- Kargar Jahromi, H., Pourahmad, M., Abedi, H. A., karimi, M. ve Kargar Jahromi, Z. (2018). Protective effects of salep against isoniazid liver toxicity in wistar rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(1), 239-243. doi:10.1016/j.jtcme.2017.06.001
- Kargar Jahromi, H., Pourahmad, M. ve Kargar Jahromi, Z. (2015). Protective Effect of Salep on Liver. *Hepatitis Monthly*, 15(4). doi:10.5812/hepatmon.15(4)2015.28137
- Kasperek, M. , ve Grimm, U. (1999). European trade in Turkish salep with special reference to Germany. *Economic Botany*, 396-406.
- Kaya, S. ve Tekin, A. R. (2001). The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering*, 47(1), 59-62. doi:10.1016/S0260-8774(00)00093-5
- Kemp, R. A., Reinders, D. M. ve Turic, B. (2007). Detection of Lung Cancer by Automated Sputum Cytometry. *Journal of Thoracic Oncology*, 2(11), 993-1000. doi:10.1097/JTO.0b013e318158d488

- Khan, I., Saeed, K. ve Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- Khan, S. A. (2020). Metal nanoparticles toxicity: role of physicochemical aspects. *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications* içinde (ss. 1-11). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-816960-5.00001-X
- Khan, S., Mansoor, S., Rafi, Z., Kumari, B., Shoaib, A., Saeed, M., ... Shakeel, F. (2022). A review on nanotechnology: Properties, applications, and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms. *Journal of Molecular Liquids*, 348, 118008. doi:10.1016/j.molliq.2021.118008
- Khuder, S. A. (2001). *Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis*. *Lung Cancer* (C. 31). www.elsevier.nl/locate/lungcan adresinden erişildi.
- Kılıç, C. (2011). Akciğerlerin Anatomisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 1-3.
- Kiani, A., Kamankesh, M., Vaisi-Raygani, A., Moradi, M.-R., Tanhapour, M., Rahimi, Z., ... Pourmotabbed, T. (2020). Activities and polymorphisms of MMP-2 and MMP-9, smoking, diabetes and risk of prostate cancer. *Molecular Biology Reports*, 47(12), 9373-9383. doi:10.1007/s11033-020-05968-5
- Kim, E. Y., Kumar, D., Khang, G. ve Lim, D. K. (2015). Recent advances in gold nanoparticle-based bioengineering applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(43), 8433-8444. doi:10.1039/c5tb01292a
- Kim, K. K., Kugler, M. C., Wolters, P. J., Robillard, L., Galvez, M. G., Brumwell, A. N., ... Chapman, H. A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13180-13185. doi:10.1073/pnas.0605669103
- Knauth, P. ve Schoonman, J. (2005). *Nanostructured materials: Selected synthesis methods, properties and applications* (Springer Science., C. 8).
- Kojima, C., Ramirez, D. C., Tokar, E. J., Himeno, S., Drobná, Z., Stýblo, M., ... Waalkes, M. P. (2009). Requirement of Arsenic Biomethylation for Oxidative DNA Damage. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 101(24), 1670-1681. doi:10.1093/jnci/djp414

- Kolahalam, L. A., Kasi Viswanath, I. V., Diwakar, B. S., Govindh, B., Reddy, V. ve Murthy, Y. L. N. (2019). Review on nanomaterials: Synthesis and applications. *Materials Today: Proceedings*, 18, 2182-2190. doi:10.1016/j.matpr.2019.07.371
- Konkel, L. (2015). Inner Workings of Arsenic: DNA Methylation Targets Offer Clues to Mechanisms of Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 123(1). doi:10.1289/ehp.123-A21
- Kozma, G., Rónavári, A., Kónya, Z. ve Kukovecz, Á. (2016). Environmentally Benign Synthesis Methods of Zero-Valent Iron Nanoparticles. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(1), 291-297. doi:10.1021/acssuschemeng.5b01185
- Kumari, S., Tyagi, M. ve Jagadevan, S. (2019). Mechanistic removal of environmental contaminants using biogenic nano-materials. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(11), 7591-7606. doi:10.1007/s13762-019-02468-3
- Kurien, B. ve Scofield, R. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293. doi:10.1016/j.ymeth.2005.11.007
- Kurzawski, M., Kaczmarek, M., Kłysz, M., Malinowski, D., Kazienko, A., Kurzawa, R. ve Drożdżik, M. (2017). MMP2 , MMP9 and TIMP2 polymorphisms affect sperm parameters but not fertility in Polish males. *Andrologia*, 49(5), e12654. doi:10.1111/and.12654
- Ladanyi, A., Mukherjee, A., Kenny, H. A., Johnson, A., Mitra, A. K., Sundaresan, S., ... Lengyel, E. (2018). Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene*, 37(17), 2285-2301. doi:10.1038/s41388-017-0093-z
- Langer, C. J., Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E. ve Soria, J. C. (2010, 20 Aralık). The evolving role of histology in the management of advanced non - small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. doi:10.1200/JCO.2010.28.8126
- Latimer, K. M. (2018). Lung cancer: clinical presentation and diagnosis. *FP essentials*, 464, 23-26.
- Lee, C., Kim, S., Lee, J. S., Lee, J. E., Kim, S., Yang, I. S., ... Cho, B. C. (2017). Next-generation sequencing reveals novel resistance mechanisms and molecular heterogeneity in EGFR-mutant non-small cell lung cancer with acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung Cancer*, 113, 106-114. doi:10.1016/j.lungcan.2017.09.005

- Lee, P. N. (2001). Relation between exposure to asbestos and smoking jointly and the risk of lung cancer. *Occupational and Environmental Medicine*, 58(3), 145-153. doi:10.1136/oem.58.3.145
- Lehmann, J. M., Lenhard, J. M., Oliver, B. B., Ringold, G. M. ve Klierwer, S. A. (1997). Peroxisome Proliferator-activated Receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  Are Activated by Indomethacin and Other Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. *Journal of Biological Chemistry*, 272(6), 3406-3410. doi:10.1074/jbc.272.6.3406
- Li, S., Jiang, M., Wang, L. ve Yu, S. (2020). Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: Recent advancement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110389. doi:10.1016/j.biopha.2020.110389
- Li, W., Li, X., Liu, S., Yang, W., Pan, F., Yang, X.-Y., ... Pan, Y. (2017). Gold nanoparticles attenuate metastasis by tumor vasculature normalization and epithelial&ndash;mesenchymal transition inhibition. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 3509-3520. doi:10.2147/IJN.S128802
- Lortet-Tieulent, J., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Rutherford, M., Weiderpass, E. ve Bray, F. (2014). International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer*, 84(1), 13-22. doi:10.1016/j.lungcan.2014.01.009
- Lumaga, M. R. B., Cozzolino, S. ve Kocyan, A. (2006). Exine Micromorphology of Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae): Phylogenetic Constraints or Ecological Influences? *Annals of Botany*, 98(1), 237-244. doi:10.1093/aob/mcl094
- Luo, C., He, M. ve Bohlin, L. (2005). Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(8), 926-933. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00150.x
- Luo, Y., Wang, Q. ve Zhang, Y. (2020). Biopolymer-Based Nanotechnology Approaches To Deliver Bioactive Compounds for Food Applications: A Perspective on the Past, Present, and Future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(46), 12993-13000. doi:10.1021/acs.jafc.0c00277
- Mahal, A., Khullar, P., Kumar, H., Kaur, G., Singh, N., Jelokhani-Niaraki, M. ve Bakshi, M. S. (2013). Green Chemistry of Zein Protein Toward the Synthesis of Bioconjugated Nanoparticles: Understanding Unfolding, Fusogenic Behavior, and Hemolysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(6), 627-639. doi:10.1021/sc300176r

- Majumder, M., Nandi, P., Omar, A., Ugwuagbo, K. ve Lala, P. (2018). EP4 as a Therapeutic Target for Aggressive Human Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1019. doi:10.3390/ijms19041019
- Mak, D. W. S., Li, S. ve Minchom, A. (2019). Challenging the recalcitrant disease—developing molecularly driven treatments for small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, 119, 132-150. doi:10.1016/J.EJCA.2019.04.037
- Makhlouf, A. S. H. ve Barhoum, A. (2018). *Makhlouf, A. S. H., & Barhoum, A. (Eds.). (2018). Emerging applications of nanoparticles and architectural nanostructures: current prospects and future trends.*
- Mamoor, S. (2020). CD36 is differentially expressed in non-small cell lung adenocarcinomas.
- Mansfield, E., Kaiser, D. L., Fujita, D. ve Van de Voorde, M. (2017). *Metrology and standardization for nanotechnology: protocols and industrial innovations* (John Wiley & Sons.).
- Mansoori, G. A. ve Soelaiman, T. A. F. (2005). *Nanotechnology-An Introduction for the Standards Community. Journal of ASTM International* (C. 2). www.astm.org adresinden erişildi.
- Mao, W., Kim, H. S., Son, Y. J., Kim, S. R. ve Yoo, H. S. (2018). Doxorubicin encapsulated clicked gold nanoparticle clusters exhibiting tumor-specific disassembly for enhanced tumor localization and computerized tomographic imaging. *Journal of Controlled Release*, 269, 52-62. doi:10.1016/j.jconrel.2017.11.003
- Markowitz, S. B., Levin, S. M., Miller, A. ve Morabia, A. (2013). Asbestos, Asbestosis, Smoking, and Lung Cancer. New Findings from the North American Insulator Cohort. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(1), 90-96. doi:10.1164/rccm.201302-0257OC
- Marx, N., Duez, H., Fruchart, J.-C. ve Staels, B. (2004). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Atherogenesis Regulators of Gene Expression in Vascular Cells. doi:10.1161/01.RES.0000127122.22685.0A
- Medda, N., De, S. K. ve Maiti, S. (2021). Different mechanisms of arsenic related signaling in cellular proliferation, apoptosis and neo-plastic transformation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111752. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111752

- Merchant, N., Nagaraju, G. P., Rajitha, B., Lammata, S., Jella, K. K., Buchwald, Z. S., ... Ali, A. N. (2017). Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer. *Carcinogenesis*, 38(8), 766-780. doi:10.1093/carcin/bgx063
- Mikhailova, E. O. (2021). Gold Nanoparticles: Biosynthesis and Potential of Biomedical Application. *Journal of Functional Biomaterials*, 12(4), 70. doi:10.3390/jfb12040070
- Minghetti, L. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(9), 901-910. doi:10.1093/jnen/63.9.901
- Mioc, A., Mioc, M., Ghiulai, R., Voicu, M., Racoviceanu, R., Trandafirescu, C., ... Soica, C. (2019). Gold Nanoparticles as Targeted Delivery Systems and Theranostic Agents in Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 26(35), 6493-6513. doi:10.2174/0929867326666190506123721
- Mittal, A. K., Chisti, Y. ve Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346-356. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.003
- Moseti, D., Regassa, A. ve Kim, W.-K. (2016). Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 124. doi:10.3390/ijms17010124
- Nadaroglu, H., Gungor, A. A. ve Selvi, İ. N. C. E. (2017). Synthesis of nanoparticles by green synthesis method. *International Journal of Innovative Research and Reviews*, 1(1), 6-9.
- Narayanan, K. B. ve Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1-2), 1-13. doi:10.1016/j.cis.2010.02.001
- Narayanan, K. B. ve Sakthivel, N. (2011). Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Advances in Colloid and Interface Science*, 169(2), 59-79. doi:10.1016/j.cis.2011.08.004
- Nath Roy, D., Goswami, R. ve Pal, A. (2017). Nanomaterial and toxicity: what can proteomics tell us about the nanotoxicology? *Xenobiotica*, 47(7), 632-643. doi:10.1080/00498254.2016.1205762

- National Research Council. (1991). Cells of origin for lung cancer. *Comparative Dosimetry of Radon in Mines and Homes*. <http://www.nap.edu/catalog/1799.html> adresinden erişildi.
- Nava-Villalba, M., Nuñez-Anita, R. E., Bontempo, A. ve Aceves, C. (2015). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Molecular Cancer*, *14*(1), 168. doi:10.1186/s12943-015-0436-8
- Needleman, P. , ve Isakson, P. C. (1997). The discovery and function of COX-2. *The Journal of Rheumatology*, *49*, 6-8.
- Noruzi, M., Zare, D. ve Davoodi, D. (2012). A rapid biosynthesis route for the preparation of gold nanoparticles by aqueous extract of cypress leaves at room temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *94*, 84-88. doi:10.1016/j.saa.2012.03.041
- Okine, B. N., Gaspar, J. C. ve Finn, D. P. (2019). PPARs and pain. *British Journal of Pharmacology*, *176*(10), 1421-1442. doi:10.1111/bph.14339
- Osmani, L., Askin, F., Gabrielson, E. ve Li, Q. K. (2018). Current WHO Guidelines and the Critical Role of Immunohistochemical Markers in the Subclassification of Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC). Moving from Targeted Therapy to Immunotherapy. *In Seminars in cancer biology* , *52*, 103-109. doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.019
- Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E. ve Tamarkin, L. (2004). Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery. *Drug Delivery*, *11*(3), 169-183. doi:10.1080/10717540490433895
- Pal, A. (2022). Western Blotting (ss. 119-127). doi:10.1007/978-1-0716-1818-9\_6
- Pan, F., Li, W., Yang, W., Yang, X., Liu, S., Li, X., ... Pan, Y. (2018). Anterior gradient 2 as a supervisory marker for tumor vessel normalization induced by anti-angiogenic treatment. *Oncology Letters*. doi:10.3892/ol.2018.8996
- Pan, J., Fan, Z., Wang, Z., Dai, Q., Xiang, Z., Yuan, F., ... Li, C. (2019). CD36 mediates palmitate acid-induced metastasis of gastric cancer via AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *38*(1), 52. doi:10.1186/s13046-019-1049-7
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., ... Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative

- stress and mitochondrial damage. *Small*, 5(18), 2067-2076. doi:10.1002/sml.200900466
- Park, H. Y., Kang, D., Shin, S. H., Yoo, K.-H., Rhee, C. K., Suh, G. Y., ... Kwon, O. J. (2020). Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer incidence in never smokers: a cohort study. *Thorax*, 75(6), 506-509. doi:10.1136/thoraxjnl-2019-213732
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C. S.-O., ... Benitah, S. A. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*, 541(7635), 41-45. doi:10.1038/nature20791
- Patel, M. I., Subbaramaiah, K., Du, B., Chang, M., Yang, P., Newman, R. A., ... Dannenberg, A. J. (2005). Celecoxib Inhibits Prostate Cancer Growth: Evidence of a Cyclooxygenase-2-Independent Mechanism. *Clinical Cancer Research*, 11(5), 1999-2007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1877
- Peng, G., Tisch, U., Adams, O., Hakim, M., Shehada, N., Broza, Y. Y., ... Haick, H. (2009). Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 4(10), 669-673. doi:10.1038/nnano.2009.235
- Perroud, H. A., Alasino, C. M., Rico, M. J., Mainetti, L. E., Queralt, F., Pezzotto, S. M., ... Graciela Scharovsky, O. (2016). Metastatic breast cancer patients treated with low-dose metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib: clinical outcomes and biomarkers of response. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(2), 365-374. doi:10.1007/s00280-015-2947-9
- Philip, D. (2010). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 42(5), 1417-1424. doi:10.1016/j.physe.2009.11.081
- Pikor, L. A., Ramnarine, V. R., Lam, S. ve Lam, W. L. (2013). Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*, 82(2), 179-189. doi:10.1016/j.lungcan.2013.07.025
- Postmus, P. E., Kerr, K. M., Oudkerk, M., Senan, S., Waller, D. A., Vansteenkiste, J., ... Peters, S. (2017). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 28, iv1-iv21. doi:10.1093/annonc/mdx222
- Pourjavadi, A., Doulabi, M., Soleyman, R., Sharif, S. ve Eghtesadi, S. A. (2012). Synthesis and characterization of a novel (salep phosphate)-based hydrogel as a

- carrier matrix for fertilizer release. *Reactive and Functional Polymers*, 72(10), 667-672. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2012.06.010
- Prudkin, L., Liu, D. D., Ozburn, N. C., Sun, M., Behrens, C., Tang, X., ... Wistuba, I. I. (2009). Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Modern Pathology*, 22(5), 668-678. doi:10.1038/modpathol.2009.19
- Qu, Y.-L., Liu, J., Zhang, L.-X., Wu, C.-M., Chu, A.-J., Wen, B.-L., ... Hou, S.-J. (2017). Asthma and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(7), 11614-11620. doi:10.18632/oncotarget.14595
- Ramalingam, V. , Varunkumar, K. , Ravikumar, V. ve Rajaram, R. (2018). Target delivery of doxorubicin tethered with PVP stabilized gold nanoparticles for effective treatment of lung cancer. *Scientific reports*, 8(1), 1-12. doi:https://doi.org/10.1038/s41598-018-22172-5
- Rami-Porta, R., Bolejack, V., Crowley, J., Ball, D., Kim, J., Lyons, G., ... Wu, Y.-L. (2015). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(7), 990-1003. doi:10.1097/JTO.0000000000000559
- Raveendran, P., Fu, J. ve Wallen, S. L. (2003). Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940-13941. doi:10.1021/ja029267j
- Reader, J., Holt, D. ve Fulton, A. (2011). Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(3-4), 449-463. doi:10.1007/s10555-011-9303-2
- Reka, A. K., Goswami, M. T., Krishnapuram, R., Standiford, T. J. ve Keshamouni, V. G. (2011). Molecular cross-regulation between PPAR- $\gamma$  and other signaling pathways: Implications for lung cancer therapy. *Lung Cancer*, 72(2), 154-159. doi:10.1016/j.lungcan.2011.01.019
- Reka, A. K., Kurapati, H., Narala, V. R., Bommer, G., Chen, J., Standiford, T. J. ve Keshamouni, V. G. (2010). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activation Inhibits Tumor Metastasis by Antagonizing Smad3-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(12), 3221-3232. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0570

- Remels, A. H. V., Langen, R. C. J., Gosker, H. R., Russell, A. P., Spaapen, F., Voncken, J. W., ... Schols, A. M. W. J. (2009). PPAR $\gamma$  inhibits NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297(1), 174-183. doi:10.1152/AJPENDO.90632.2008
- Rigamonti, E., Chinetti-Gbaguidi, G. ve Staels, B. (2008). Regulation of Macrophage Functions by PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , and LXRs in Mice and Men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(6), 1050-1059. doi:10.1161/ATVBAHA.107.158998
- Rizk, N., Christoforou, N. ve Lee, S. (2016). Optimization of anti-cancer drugs and a targeting molecule on multifunctional gold nanoparticles. *Nanotechnology*, 27(18), 185704. doi:10.1088/0957-4484/27/18/185704
- Rizwan, M., Shoukat, A., Ayub, A., Razzaq, B. ve Tahir, M. B. (2021). Types and classification of nanomaterials. *Nanomaterials: Synthesis, Characterization, Hazards and Safety* içinde (ss. 31-54). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-823823-3.00001-X
- Robertson, A., Allen, J., Laney, R. ve Curnow, A. (2013). The Cellular and Molecular Carcinogenic Effects of Radon Exposure: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14024-14063. doi:10.3390/ijms140714024
- Rock, J. R., Onaitis, M. W., Rawlins, E. L., Lu, Y., Clark, C. P., Xue, Y., ... Hogan, B. L. M. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12771-12775. doi:10.1073/PNAS.0906850106
- Roughead, E. E., Ramsay, E., Pratt, N. ve Gilbert, A. L. (2008). NSAID Use in Individuals at Risk of Renal Adverse Events. *Drug Safety*, 31(11), 997-1003. doi:10.2165/00002018-200831110-00004
- Roy, S. , Ghosh, C. K. , ve Sarkar, C. K. (2017). *Nanotechnology: synthesis to applications* (CRC Press.).
- Sajid, M. (2022). Nanomaterials: types, properties, recent advances, and toxicity concerns. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 25, 100319. doi:10.1016/j.coesh.2021.100319
- Santhosh, P. B., Genova, J. ve Chamati, H. (2022). Green Synthesis of Gold Nanoparticles: An Eco-Friendly Approach. *Chemistry*, 4(2), 345-369. doi:10.3390/chemistry4020026

- Sardar, R., Funston, A. M., Mulvaney, P. ve Murray, R. W. (2009). Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future. *Langmuir*, 25(24), 13840-13851. doi:10.1021/la9019475
- Satapathy, S. R., Nayak, A., Siddharth, S., Das, S., Nayak, D. ve Kundu, C. N. (2018). Metallic gold and bioactive quinacrine hybrid nanoparticles inhibit oral cancer stem cell and angiogenesis by deregulating inflammatory cytokines in p53 dependent manner. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(3), 883-896. doi:10.1016/j.nano.2018.01.007
- Schmid, G. ve Corain, B. (2003). Nanoparticulated Gold: Syntheses, Structures, Electronics, and Reactivities. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2003(17), 3081-3098. doi:10.1002/ejic.200300187
- Schönthal, A. H. (2007). Direct non-cyclooxygenase-2 targets of celecoxib and their potential relevance for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 97(11), 1465-1468. doi:10.1038/sj.bjc.6604049
- Schreiber, G. ve McCrory, D. C. (2003). Performance Characteristics of Different Modalities for Diagnosis of Suspected Lung Cancer\*. *Chest*, 123(1), 115S-128S. doi:10.1378/chest.123.1\_suppl.115S
- Schulte, E., Schumacker, U. ve Schünke, M. (2015). *Anatomi Atlası Prometheus Cilt 2: İç Organlar* (Palme Yayınevi., C. 2).
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J. ve Isakson, P. (1997). Distribution of Cox-1 and Cox-2 in Normal and Inflamed Tissues (ss. 167-170). doi:10.1007/978-1-4615-5325-0\_24
- Seiri, P., Abi, A. ve Soukhtanloo, M. (2019). PPAR- $\gamma$ : Its ligand and its regulation by microRNAs. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(7), 10893-10908. doi:10.1002/jcb.28419
- Sertznig, P., Seifert, M., Tilgen, W. ve Reichrath, J. (2007, Temmuz). Present concepts and future outlook: Function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.20998
- Sett, A., Gadewar, M., Sharma, P., Deka, M. ve Bora, U. (2016). Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of *Dillenia indica*. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(2), 025005. doi:10.1088/2043-6262/7/2/025005
- Sextro, R. G. (1994). *Radon and the natural environment. Radon: prevalence, measurements, health risks and control* (C. 15).

- Shim, J., Brindle, L., Simon, M. ve George, S. (2014). A systematic review of symptomatic diagnosis of lung cancer. *Family Practice*, 31(2), 137-148. doi:10.1093/fampra/cmt076
- Siegel, Miller, K. D. , ve Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34. doi:https://doi.org/10.3322/caac.21551
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S. ve Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17-48. doi:10.3322/CAAC.21763
- Singh, V., Khullar, P., Dave, P. N., Kaur, G. ve Bakshi, M. S. (2013). Ecofriendly Route To Synthesize Nanomaterials for Biomedical Applications: Bioactive Polymers on Shape-Controlled Effects of Nanomaterials under Different Reaction Conditions. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(11), 1417-1431. doi:10.1021/sc400159x
- Smith, W. L., DeWitt, D. L. ve Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 145-182. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.145
- Song, H. B., Wi, J.-S., Jo, D. H., Kim, J. H., Lee, S.-W., Lee, T. G. ve Kim, J. H. (2017). Intraocular application of gold nanodisks optically tuned for optical coherence tomography: inhibitory effect on retinal neovascularization without unbearable toxicity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(6), 1901-1911. doi:10.1016/j.nano.2017.03.016
- Soto, K. M., Mendoza, S., López-Romero, J. M., Gasca-Tirado, J. R. ve Manzano-Ramírez, A. (2021). Gold nanoparticles: synthesis, application in colon cancer therapy and new approaches - review. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 14(4), 665-678. doi:10.1080/17518253.2021.1998648
- Sperling, R. A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M. ve Parak, W. J. (2008). Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 37(9), 1896. doi:10.1039/b712170a
- Srivastava, H. , Sahu, P. , ve Misra, S. (2018). Role of Ultrasound in the Synthesis of Nanoparticles and Remediation of Environmental Pollutants. . *Materials Research Foundations* içinde (C. 27, ss. 1-40).
- Srivastava, S. K. , Yamada, R. , Ogino, C. , ve Kondo, A. (2013). Biogenic synthesis and characterization of goldnanoparticles by Escherichia coli K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol. *Nanoscale research letters*, 8(1), 1-9.

- Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K. S., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., ... Kelloff, G. (2000). The Effect of Celecoxib, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor, in Familial Adenomatous Polyposis. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1946-1952. doi:10.1056/NEJM200006293422603
- Stocks, J. , ve Hislop, A. A. (2002). Structure and function of the respiratory system. *Drug delivery to the lung* içinde (ss. 47-104).
- Sun, Q., Zhang, W., Wang, L., Guo, F., Song, D., Zhang, Q., ... Wang, J. (2018). Hypermethylated CD36 gene affected the progression of lung cancer. *Gene*, 678, 395-406. doi:10.1016/j.gene.2018.06.101
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. doi:10.3322/CAAC.21660
- Surapaneni, S. K., Bashir, S. ve Tikoo, K. (2018). Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. *Scientific Reports*, 8(1), 12295. doi:10.1038/s41598-018-30541-3
- Szabo, E., Mao, J. T., Lam, S., Reid, M. E. ve Keith, R. L. (2013). Chemoprevention of Lung Cancer, Diagnosis and Management Of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5), 40-60. doi:10.1378/chest.1435S1
- Tamez Ramírez, M. del S. ve Vega-Cantú, Y. I. (2019). Nanotechnology learning through product development. *International Journal on Interactive Design and Manufacturing (IJIDeM)*, 13(3), 1013-1027. doi:10.1007/s12008-019-00561-y
- Tang, M. shong, Wu, X. R., Lee, H. W., Xia, Y., Deng, F. M., Moreira, A. L., ... Lepor, H. (2019). Electronic-cigarette smoke induces lung adenocarcinoma and bladder urothelial hyperplasia in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(43), 21727-21731. doi:10.1073/PNAS.1911321116/-/DCSUPPLEMENTAL
- Tartour, E. ve Zitvogel, L. (2013). Lung cancer: potential targets for immunotherapy. *The Lancet Respiratory Medicine*, 1(7), 551-563. doi:10.1016/S2213-2600(13)70159-0
- Tatsui, C. E., Lang, F. F., Gumin, J., Suki, D., Shinojima, N. ve Rhines, L. D. (2009). An orthotopic murine model of human spinal metastasis: histological and functional

- correlations. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 10(6), 501-512. doi:10.3171/2009.2.SPINE08391
- Taylor, S. C. ve Posch, A. (2014). The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*, 2014, 1-8. doi:10.1155/2014/361590
- Tekinsen, O. C. ve Karacabey, A. (1984). *Effect of Some Stabilizers Mix on Physical and Organoleptic Properties of Ice-Cream Kahramanmaras Type*. Ankara, Turkey: Tubitak, Projects No: VHAG 594.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442-454. doi:10.1038/nrc822
- Thiery, J. P. ve Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 131-142. doi:10.1038/nrm1835
- Tian, L., Lu, L., Qiao, Y., Ravi, S., Salatan, F. ve Melancon, M. (2016). Stimuli-Responsive Gold Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Journal of Functional Biomaterials*, 7(3), 19. doi:10.3390/jfb7030019
- Tjomsland, V., Pomianowska, E., Aasrum, M., Sandnes, D., Verbeke, C. S. ve Gladhaug, I. P. (2016). Profile of MMP and TIMP Expression in Human Pancreatic Stellate Cells: Regulation by IL-1 $\alpha$  and TGF $\beta$  and Implications for Migration of Pancreatic Cancer Cells. *Neoplasia*, 18(7), 447-456. doi:10.1016/j.neo.2016.06.003
- Tołoczko-Iwaniuk, N., Dziemiańczyk-Pakiela, D., Nowaszewska, B. K., Celińska-Janowicz, K. ve Milytyk, W. (2019). Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention – Review. *Current Drug Targets*, 20(3), 302-315. doi:10.2174/1389450119666180803121737
- Tomic, R., Podgaetz, E., Andrade, R. S. ve Dincer, H. E. (2015). Cryotechnology in Diagnosing and Treating Lung Diseases. *Journal of Bronchology & Interventional Pulmonology*, 22(1), 76-84. doi:10.1097/LBR.0000000000000103
- Towfighi, A. ve Ovbiagele, B. (2008). Partial Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist Angiotensin Receptor Blockers. *Cerebrovascular Diseases*, 26(2), 106-112. doi:10.1159/000139656
- Travis, W. D. (2011). Pathology of Lung Cancer. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 669-692. doi:10.1016/j.ccm.2011.08.005
- Travis, W. D. (2014). Pathology and Diagnosis of Neuroendocrine Tumors. *Thoracic Surgery Clinics*, 24(3), 257-266. doi:10.1016/j.thorsurg.2014.04.001

- Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A. ve Nicholson, A. G. (2015). Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1240-1242. doi:10.1097/JTO.0000000000000663
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., ... Yankelewitz, D. (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(2), 244-285. doi:10.1097/JTO.0b013e318206a221
- Tsuji, M., Miyamae, N., Hashimoto, M., Nishio, M., Hikino, S., Ishigami, N. ve Tanaka, I. (2007). Shape and size controlled synthesis of gold nanocrystals using oxidative etching by AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> anions in microwave-polyol process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 302(1-3), 587-598. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.03.044
- Tsung, A., Kargiotis, O., Chetty, C., Lakka, S., Gujrati, M., Spomar, D., ... Rao, J. (2008). Downregulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) utilizing adenovirus-mediated transfer of small interfering RNA (siRNA) in a novel spinal metastatic melanoma model. *International Journal of Oncology*. doi:10.3892/ijo.32.3.557
- Tugwood, J. D., Issemann, I., Anderson, R. G., Bundell, K. R., McPheat, W. L. ve Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *The EMBO Journal*, 11(2), 433-439. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05072.x
- United States Environmental Protection Agency. (2023, 17 Ekim). Health Risk of Radon. <https://www.epa.gov/radon/health-risk-radon#:~:text=Radon%20is%20the%20number%20one,people%20who%20have%20never%20smoked.>
- Unur, E., Ülger, H. ve Ekinci, N. (2012). *Anatomi* (Kıvılcım Kitabevi., C. 4). Kayseri.
- Vallières, E., Shepherd, F. A., Crowley, J., Van Houtte, P., Postmus, P. E. ve Carney, D. (2009). *The IASLC Lung Cancer Staging Project Proposals Regarding the Relevance of TNM in the Pathologic Staging of Small Cell Lung Cancer in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer.*
- Vira, H. J. , Pradhan, V. D. , Umare, V. D. , Chaudhary, A. K. , Rajadhyksha, A. G. , Nadkar, M. Y. , ve Nadkarni, A. H. (2020). Expression of the matrix

- metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in systemic lupus erythematosus patients. *Neth J Med*, 78(5), 261-268.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A. ve Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339(6127), 1546-1558. doi:10.1126/science.1235122
- Wang, A. Z., Langer, R. ve Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annual Review of Medicine*. doi:10.1146/annurev-med-040210-162544
- Wang, D. ve DuBois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 181-193. doi:10.1038/nrc2809
- Wang, D. ve DuBois, R. N. (2018). Role of prostanoids in gastrointestinal cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 128(7), 2732-2742. doi:10.1172/JCI97953
- Wang, X., Qian, Z. (Min), Zhang, Z., Cai, M., Chen, L., Wu, Y., ... Lin, H. (2022). Population attributable fraction of lung cancer due to genetic variants, modifiable risk factors, and their interactions: a nationwide prospective cohort study. *Chemosphere*, 301, 134773. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.134773
- Wang, Y., Xu, J., Shi, L. ve Yang, H. (2020). Recent advances in the antilung cancer activity of biosynthesized gold nanoparticles. *Journal of Cellular Physiology*, 235(12), 8951-8957. doi:10.1002/jcp.29789
- Wei, S., Zhang, H. ve Tao, S. (2019). A review of arsenic exposure and lung cancer. *Toxicology Research*, 8(3), 319-327. doi:10.1039/C8TX00298C
- Willoughby, D. A., Moore, A. R. ve Colville-Nash, P. R. (2000). COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet*, 355(9204), 646-648. doi:10.1016/S0140-6736(99)12031-2
- World Health Organization. (2023). Cancer.
- Wu, A.-W. (2004). COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 10(16), 2323. doi:10.3748/wjg.v10.i16.2323
- Xiao, D. ve He, J. (2010). Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *Journal of thoracic disease*, 2(3), 154-9. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2010.02.03.7
- Xu, X.-C. (2002). COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anti-Cancer Drugs*, 13(2), 127-137. doi:10.1097/00001813-200202000-00003
- Yang, C.-X., Xing, L., Chang, X., Zhou, T.-J., Bi, Y.-Y., Yu, Z.-Q., ... Jiang, H.-L. (2020). Synergistic Platinum(II) Prodrug Nanoparticles for Enhanced Breast Cancer

- Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 17(4), 1300-1309.  
doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b01318
- Yang, W.-L. (2001). Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 22(9), 1379-1383.  
doi:10.1093/carcin/22.9.1379
- Yılmaz, H. H. , Yazıhan, N. , Tunca, D. , Sevinç, A. , Olcayto, E. Ö. , Özgül, N. , ve Tuncer, M. (2011). Cancer Trends and Incidence and Mortality Patterns in Turkey. *Japanese journal of clinical oncology*, 41(1), 10-16.  
doi:https://doi.org/10.1093/jjco/hyq075
- Yin, Y. ve Talapin, D. (2013). The chemistry of functional nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 42(7), 2484. doi:10.1039/c3cs90011h
- Zarogoulidis, K. , Latsios, D. , Porpodis, K. , Zarogoulidis, P. , Darwiche, K. , Antoniou, N. , ve Kontakiotis, T. (2013). New dilemmas in small-cell lung cancer TNM clinical staging. *OncoTargets and therapy*, 6, 539.
- Zeiri, Y., Elia, P., Zach, R., Hazan, S., Kolusheva, S. ve Porat, Z. (2014). Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *International Journal of Nanomedicine*, 4007. doi:10.2147/IJN.S57343
- Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., ... Kalluri, R. (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine*, 13(8), 952-961.  
doi:10.1038/nm1613
- Zhang, Q. ve Xu, K. (2022). The role of regulators of RNA m6A methylation in lung cancer. *Genes and Diseases*. Chongqing University.  
doi:10.1016/j.gendis.2021.12.017
- Zhang, X. Y., Chen, L.-H. ve Guan, Y.-F. (2005). [PPAR family and its relationship to metabolic syndrome]. *Sheng li ke xue jin zhan [Progress in physiology]*, 36(1), 6-12.
- Zhou, J., Febbraio, M., Wada, T., Zhai, Y., Kuruba, R., He, J., ... Xie, W. (2008). Hepatic Fatty Acid Transporter Cd36 Is a Common Target of LXR, PXR, and PPAR $\gamma$  in Promoting Steatosis. *Gastroenterology*, 134(2), 556-567.e1.  
doi:10.1053/j.gastro.2007.11.037